

Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg
Muskuloskeletal-Research-Unit (MSRU)

Evaluation der BoneWelding® Technologie zur Verankerung von Implantaten im Knochen – eine Studie am Schaf

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Jens David Langhoff

Tierarzt
aus Köln, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Lutz-Peter Nolte, Korreferent

Zürich 2006

Inhalt

1 Zusammenfassung	5
2 Einleitung	9
3 Material und Methode	12
3.1 IMPLANTATE UND BIOMATERIALIEN	12
3.2 ULTRASCHALLGERÄT	13
3.3 STUDIENDESIGN UND CHIRURGISCHES VORGEHEN	13
3.4 PROBENAUFBEREITUNG UND EVALUATION	15
4 Resultate	18
4.1 DIE OPERATION	18
4.2 RADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	19
4.3 MAKORADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	19
4.4 MAKROSKOPISCHE EVALUATION	20
4.5 HISTOLOGISCH-MORPHOLOGISCHE EVALUATION	20
4.5.1 PLA-IMPLANTAT	21
4.5.2 TITANIMPLANTAT	22
4.5.3 HISTOMORPHOMETRISCHE EVALUATION	23
4.5.4 MIKORADIOGRAPHISCHE EVALUATION	24
4.6 HISTOLOGISCH-ZELLULÄRE EVALUATION	24
5 Diskussion	27
5.1 ZIEL DER STUDIE	27
5.2 VERSUCHSMODELL	27
5.3 CHIRURGISCHES VORGEHEN	27
5.4 RADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	28
5.5 MAKORADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	28
5.6 MAKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	29
5.7 PROBENAUFBEREITUNG UND EVALUATION	29
5.8 HISTOLOGISCH-MORPHOLOGISCHE EVALUATION	30
5.8.1 AM PLA-IMPLANTAT	30
5.8.1.1 IM SPONGIÖSEN KNOCHEN	30
5.8.1.2 IM KORTIKALEN KNOCHEN	33
5.8.2 AM TITANIMPLANTAT	34
5.8.3 HISTOMORPHOMETRISCH-STATISTISCHE EVALUATION	34
5.9 HISTOLOGISCH-ZELLULÄRE EVALUATION	35
5.10 GESAMTURTEIL	37
5.11 PERSPEKTIVEN	37
6 Literaturverzeichnis	39
7 Anhang	43
7.1 TABELLEN	43
7.2 ABBILDUNGEN	52
8 Danksagung	73

1 Zusammenfassung

EINFÜHRUNG: Die innovative BoneWelding® Technologie eröffnet völlig neue Möglichkeiten Implantate im Knochen zu verankern. Mittels Ultraschallenergie aufgeschmolzener abbaubarer Kunststoff (Poly-L-DL-Laktid) dringt in die Strukturen des vorgebohrten Knochens und kann somit auch im mechanisch schwachem Knochen, wie dem osteoporotischen Knochen, 2-3 mal höhere Haltekräfte übertragen als herkömmliche Knochenschrauben.

MATERIAL UND METHODE: In dieser ersten experimentellen Tierstudie wurde die Implantationstechnologie an 6 Schafen mit einem reinen PLA-Implantat und einer PLA-Titan-Kombination auf seine Biokompatibilität geprüft. Von jedem Implantattyp wurden 4 Stück im Bereich des distalen Femurs und der proximalen Tibia an einem Hinterbein implantiert. In zwei Gruppen, mit 2 und 6 monatiger Versuchszeit, wurden je 3 Schafe geschlachtet und die entnommenen Proben makroskopisch, radiologisch, histologisch und histomorphometrisch ausgewertet. Als Kriterien für die Biokompatibilität wurden fehlende Zeichen von Entzündung und eine erfolgte Integration (Einwachsen) des Implantats im Knochen gewertet.

ERGEBNISSE: Bei der Operation zeigte sich die Implantationsmethode als gut zu handhaben. Nach Versuchsende wurden makro- und mikroskopisch keine Entzündungszeichen gefunden. Schon ab 2 monatiger Implantationszeit waren die Implantate gut integriert und signifikant ($p=0.0003$) mehr von neuem Knochen umgeben. Bis zum 6. Versuchsmonat war der neu gebildete Knochen bereits umgebaut und in seiner Struktur optimiert. Die Knochenmenge am Implantat hatte sich dabei signifikant verringert ($p=0.016$). Zwischen den Implantattypen bestand kein signifikanter Unterschied, jedoch hatten die Titanimplantate eine tendenziell größere Knochenmenge am Implantat als die PLA-Implantate.

DISKUSSION: Die Ergebnisse aller Analysen weisen der BoneWelding® Technologie eine gute biologische Verträglichkeit nach. Das macht sie mit ihren mechanischen Eigenschaften zu einer potenten Plattformtechnologie für eine Vielzahl von Anwendungsgebieten der Knochenchirurgie, bei der eine schnelle und wirksame Verankerung benötigt wird.

Abstract

INTRODUCTION: The new BoneWelding® Technology opens completely new possibilities of anchoring implants into bone. A degradable polymer (Poly L- DL Lactide) melts by means of ultrasonic power and penetrates into the structures of the pre-drilled bone. The adaption of the implant to the bone structures enables it to provide 2-3 times higher retaining forces than conventional bone screws. This property is very promising for mechanically weak bone, as found in osteoporosis.

MATERIALS AND METHODS: In this first experimental animal study the implantation technology was evaluated for its biocompatibility in 6 sheep. Two implant designs, a pure PLA implant and a PLA-titanium combination were tested. Four implants of each type were implanted in the distal femur and the proximal tibia of the same hind limb. In two groups, with 2 and 6 months observation period, 3 sheep each were slaughtered. Samples were analyzed macroscopically, radiologically, histologically and histomorphometrically. As criteria for biocompatibility, good integration of the implant within the bone and absence of inflammation were defined.

RESULTS: The implantation method demonstrated good handling. The macro- and microscopical evaluation showed no signs of inflammation. Implants were already well integrated at 2 months and new bone was already built up significantly ($p = 0.0003$) compared to the surrounding bone. At 6 months bone was already remodeled and its conformation optimized and the bone quantity around the implant had been significantly reduced ($p=0.016$). No significant difference could be observed between the implant types, however the titanium implants had a tendency for larger bone quantity directly at the implant compared to the PLA pins.

DISCUSSION: The results of all analyses confirm good biocompatibility and anchorage of the implants within cancellous and cortical bone. Overall the BoneWelding® Technology holds an promising future perspective as a platform technology for many areas of application in the field of bone surgery.

2 Einleitung

In der Chirurgie ist die Verankerung von Implantaten im Knochen eine elementare Technik bei der Frakturbehandlung. Dabei müssen Knochenteile miteinander oder mit einem stützenden Element fest verbunden werden. Üblicherweise kommen spezielle Knochenschrauben und Platten zum Einsatz. Die etablierte Osteosynthese mit metallischen Werkstoffen ermöglicht auch kompliziert gebrochene Knochen heilen zu lassen. Auch einfache Frakturen - vorher allein durch die konservative Therapie der Ruhigstellung geheilt - können damit besser stabilisiert und die Funktion des Knochens schneller wiederhergestellt werden. Grenzen hat diese Methode jedoch bei schwachen Knochenstrukturen, beispielsweise im Unterkiefer und im osteoporotischen Knochen. Dort finden Schrauben und andere Implantate zu wenig Halt für eine ausreichende Belastbarkeit [1-3]. Gerade die Osteoporose (Knochenschwund) gewinnt mit der zunehmend alternden Bevölkerung in Industriestaaten an Bedeutung. Die Osteoporose ist eine Erkrankung des gesamten Skeletts, charakterisiert durch eine Verringerung der Knochenmasse und Verschlechterung der Gewebsstruktur. Der Knochen verliert an Stabilität und Elastizität.

Infolgedessen nimmt die Brüchigkeit des Knochens zu [4].

Implantaten unter diesen schwierigen Bedingung Halt zu verschaffen ist ein großes Thema heutiger Entwicklungsanstrengungen. Hierzu verspricht die von der Firma WoodWelding SA, Zürich, patentierte und entwickelte BoneWelding® Technologie einen völlig neuen und viel versprechenden Ansatz. Sie vereint die Verflüssigung und Resorbierbarkeit eines Polymers mit einer wesentlich besseren Verankerung als eine Verschraubung allein.

Neuartig dabei ist es, das Polymer mittels Ultraschallenergie während der Insertion der Implantate oberflächlich aufzuschmelzen. Die flüssige Phase infiltriert die an das Implantat angrenzenden Hohlräume und legt sich dabei den vorhandenen wie auch operativ erzeugten Strukturen an. Durch die Wärmeabsorption des Implantates und des Gewebes wird das Polymer sofort wieder fest sobald keine Ultraschallenergie mehr angewendet wird.

Die BoneWelding® Technologie ist als eine Plattformtechnologie zu verstehen. In Kombination mit anderen Materialien und Techniken sollen Weiterentwicklungen in vielen Bereichen der Hartgewebechirurgie folgen. In dieser Studie sollte mittels eines Zylinderstifts aus Poly-L-DL-Laktid (PLA) sowie mit einer PLA-Titan-Kombination, als anwendungsnahem Konzept für lasttragende Implantate, die Biokompatibilität der BoneWelding® Technologie getestet werden. Unter Biokompatibilität werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die folgenden Aspekte der kurz- und mittelfristigen Gewebereaktionen verstanden: Äußerlich am Implantationsort sichtbare Entzündungszeichen (Rötung und Schwellung), radiologisch und histologisch/histomorphometrisch erfassbare Resorption (mit eventuellem bindegewebigem Ersatz) oder Aufbau von Knochensubstanz und histologisch nachweisbare Entzündungsreaktion. In Vorstudien an Kadaverknochen (Schaf, distaler Femur und proximale Tibia) wurde gemessen, ob die Wärmemeentwicklung beim Einbringprozess durch Ultraschall zu potentiell kritischen Temperaturerhöhungen führen könnte. Hierzu wurden Temperaturfühler in der direkten Umgebung des Implantationsortes, 0,5 bis 1,0 mm von der Implantatoberfläche, platziert. Die Ergebnisse ergaben über wenige Sekunden wirkende Temperaturerhöhungen von durchschnittlich 14° und maximal 22° C [5]. Die gemessenen Temperaturerhöhungen sind sowohl in ihrer Höhe wie auch in der Einwirkzeit deutlich niedriger, als sie für Bohrvorgänge im Knochen dokumentiert wurden [6]. Es konnte daher das Temperaturrisiko des Implantationsverfahrens als ausreichend gering eingestuft werden, um in einem Tierversuch auf seine Biokompatibilität hin überprüft werden zu können [7-10]. Die realisierte Tierstudie ist in den folgenden Kapiteln beschrieben. Im Vordergrund stand die Frage der tatsächlichen Auswirkungen der Wärmeentwicklung in einem komplexen Organismus, der dem Menschen bestmöglich gleicht. In dieser Studie wurden ausschließlich Materialien verwendet, die bereits klinisch zugelassen und hinreichend erprobt sind (PLA [11-17] und Titan [18-22]). Somit war von den Komponenten Polylaktid und Titan kein negativer Einfluss zu erwarten. Auf Referenzimplantate, die ohne die Ultraschallinsertion eingebracht werden, konnte durch diesen Umstand

verzichtet werden.

Es wurden Implantationsorte mit einem Spektrum von kortikalem bis spongiösen Knochen gewählt, um Ergebnisse für einen vielfältigen Einsatz der Methode zu erhalten. Auf mechanische Tests konnte aufgrund der positiven Ergebnisse von vorhergehenden biomechanischen Studien vorerst verzichtet werden.

In diesen am Kadaver- und osteoporotischen Leichenknochen wie auch am Knochenersatzmodel durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass sich mit der BoneWelding® Technologie eine im Vergleich zu Schraubenimplantaten signifikant verbesserte Verankerung erreichen lässt [6, 23].

Mit dem vorliegenden Studienaufbau konnte die Anzahl der Versuchstiere auf einem ethisch vertretbaren niedrigen Niveau gehalten werden.

3 Material und Methode

3.1 IMPLANTATE UND BIOMATERIALEN

Der PLA Stift ist ein konisch endender Zylinder, 3,5 mm im Durchmesser und 25 mm lang (Abb. 1). Davon wurden allerdings nur 10 mm in den Knochen versenkt. Die weiteren proximalen 15 mm dienten der Aufnahme und Führung im Ultraschallgerät. Der Stift wurde im Spritzgussverfahren unter Reinraumbedingungen hergestellt und, nach Trocknung und Verpackung unter Stickstoff, gamma-sterilisiert. Als Material wurde ein Co-Polymer aus 70% L- Laktid und 30% DL-Laktid (Poly-L-DL-Laktid Resomer LR 708, Böhringer Ingelheim, Deutschland) verwendet.

Das Implantat weist einen grösseren Durchmesser als das vorgesehene Bohrloch (3mm) auf, so dass genügend Material für die Hohlräume, insbesondere im spongiösen Knochen, zur Verfügung steht. Um auch im kortikalen Knochen Raum für das Fliessen des Polymers zu schaffen, wurden die mit 3mm vorgebohrten Löcher im kortikalen Bereich mit einem 3.5mm AO Gewindebohrer nachgeschnitten.

Der Titanstift zeigt ebenfalls die Form eines konisch endenden Zylinders, ist jedoch mit einem Durchmesser von 2,8 mm und einer Länge von 10 mm kleiner dimensioniert. Der damit erreichte Spalt von 0,1 mm zwischen Bohrloch (3 mm) und Titanimplantat sollte eine direkte Übertragung der Ultraschallenergie vom Titananteil auf das Knochengewebe vermeiden (Abb. 2). Es wurde ein Titan Grad 4 verwendet, welches vor der Beschichtung durch das PLA durch einen für Dentalimplantate etabliertes Sandstrahl- und Ätzverfahren aufgeraut worden war. Der Stift besitzt in der Längsachse zwei sich gegenüberliegende Streifen aus Resomer LR 708 (1 mm breit, 8 mm lang und ca. 1 mm hoch). Diese wurden unter Reinraumbedingungen durch einen thermischen Sinterprozess mit der Titanoberfläche verbunden. Die Höhe der PLA-Streifen wurde so eingestellt, dass der Durchmesser des Implantates an dieser Stelle ca. 3.8 mm betrug. Für Trocknung, Verpackung und Sterilisation wurde das gleiche Verfahren wie für den PLA Stift verwendet. Der Zylinder wurde proximal mit einem Innengewinde

versehen, um ein für die Implantation notwendiges Adapterstück temporär einschrauben zu können. Das Adapterstück dient der Ankopplung an die Sonotrodenspitze des Ultraschallgerätes. Nach erfolgter Implantation wird der Adapter durch eine Schraube ersetzt, die den Hohlraum des Stiftes verschließt.

3.2 ULTRASCHALLGERÄT

Zum Einsatz kam ein kommerziell erhältliches Ultraschallgerät (Branson E-150, Arbeitsfrequenz 20 kHz; Amplitude von 40 µm an der Spitze der Sonotrode; max. Energie, 150 W, Branson Ultrasonics SA, Carouge, Schweiz) (Abb. 3), wie es für das Schneiden von Textilien oder für das Verschweissen von Kunststoffteilen eingesetzt wird. Zur Implantation wurde für beide Implantattypen mit einer Amplitudeneinstellung von 50% gearbeitet. Während des Implantationsprozesses wird die Schallenergie durch die longitudinale Schallwelle so auf das Implantat übertragen, dass es zu schwingen beginnt und die Polymeroberfläche beim Kontakt mit dem Knochen lokal aufschmilzt. Das Gerät wurde für die Implantationsschritte mit einem Endoskopschlauch steril abgedeckt. Die frei liegende Spitze des Instruments wurde chemisch desinfiziert. Die Sonotrodenspitze konnte für die unterschiedlichen Durchmesser der Implantate mittels Schraubenschlüsseln angepasst werden (Abb. 4).

3.3 STUDIENDESIGN UND CHIRURGISCHES VORGEHEN

Sechs (6) erwachsene Schweizer Alpenschafe (2-4 Jahre alt mit einem Gewicht zwischen 66 und 84 kg) wurden in dem vom kantonalen Veterinäramt genehmigten Tierversuch (Bewilligungsnummer 92/2002) verwendet. Vor der Operation wurden die Tiere klinisch und hämatologisch untersucht sowie routinemäßig antiparasitär (Endex® 19.5%; 1ml/5kg; Novartis AG, Basel, Schweiz) behandelt. Zur Eingewöhnung wurden die Tiere 2 Wochen vor dem OP-Termin in die Stallungen des Tierspitals verlegt. 24 Stunden vor der Operation wurden die Tiere, bei freiem Zugang zu Wasser, gefastet. Vor der Operation wurde dem Tier ein jugularer Katheter gelegt und die Prämedikation

verabreicht. Die Prämedikation bestand aus einer Sedation mit 5 µg/kg Medetomidin (Domitor®, Dr. Gräub AG, Bern, Schweiz), der perioperativen Antibiose mit 30000 IU/kg Penicillin G (Grünenthal 10 Mega®, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) und 6 mg/kg Gentamicinsulfat (G.Streuli AG, Uznach, Schweiz). Die perioperative Analgesie wurde mit 0.01 mg/kg Buprenorphin (Temgesic®, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) intramuskulär und die Entzündungshemmung mit 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer AG, Zürich, Schweiz) intravenös erreicht. Die Anästhesie wurde mit einer Kombination aus 2 mg/kg Ketamin (Narketan®, Vetoquinol AG, Bern, Schweiz) und 0.1 mg Diazepam (Valium®, Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz) in den Jugularkatheter eingeleitet. Nach Intubation wurde eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Forene®, Abbott AG, Baar, Schweiz) fortgeführt.

Der Versuch bestand aus 2 Gruppen mit jeweils 3 Tieren. Bei Gruppe I betrug die Versuchsdauer 2 Monate und bei Gruppe II 6 Monate. Jedes Tier wurde abwechselnd an dem rechten oder linken Bein operiert. Nach einem medialen Zugang zum distalen Femur und der proximalen Tibia wurden monokortikale Löcher mit einem Durchmesser von 3 mm und 10 mm Länge gebohrt. Zusätzlich wurde im Kortex mittels eines 3.5mm AO Gewindebohrers ein Gewinde geschnitten, um dem fließenden Polymer auch im dichten kortikalen Knochen eine Struktur für die Verankerung zu geben. Zudem wird der Anteil an überschüssigem Polymer, das an der Bohrlochkante abgeschert wird, möglichst gering gehalten.

Insgesamt wurden pro Tier 4 PLA- und 4 Titanstifte an 4 verschiedenen Stellen (eine in dem distalen Femur und drei in die proximale Tibia) eingesetzt (Tab. 1, Abb. 5,6).

An jede Lokalisation kam ein Paar von einem PLA- und einem Ti-Implantat mit einem Abstand von 10 mm zueinander. Jede Lokalisation lag mindestens 20 mm voneinander entfernt. Die Lokalisationen wurden so gewählt, dass zwei in rein spongiösem (1 und 2), eine im rein kortikalen (4) und eine im Übergang zwischen spongiös und kortikalen Knochen (3) lagen. Die Implantate wurden 10mm tief in den Knochen versenkt. Bei dem PLA Implantat wurde

der überstehende Implantatteil abgetrennt. Die Operationswunde wurde routinemäßig mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 2/0, Johnson&Johnson Intl., Brüssel, Belgien) und einem Hautstapler (Davis und Geck Appose ULC®, B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen. Die Antibiose, Entzündungshemmung und Analgesie wurde für 4 Tage fortgesetzt.

3.4 PROBENAUFBEREITUNG UND EVALUATION

Direkt nach der Operation wurden Röntgenaufnahmen angefertigt – mediolateral und anteposterior (mobiles Röntgengerät; Exposition 65 kV, 0,1 Sekunden). Anhand dieser Aufnahmen konnte die korrekte Platzierung der Implantate und mögliche Risse im Knochen ermittelt werden. Unmittelbar nach der Schlachtung wurden die Knochen entnommen und erneut geröntgt (Faxitron x-ray systems, Hewlett Packard, Oregon, USA. Bestrahlung: 45 kV für eine Sekunde) und die genaue Lokalisierung und Orientierung der Stifte im Knochen, für die spätere Zerteilung, zu ermitteln (Abb. 6).

Die Implantationsstellen wurden makroskopisch nach Entzündungszeichen und anderen Veränderungen untersucht und semiquantitativ bewertet. Im Weiteren wurden die Operationsstellen (Implantate mit angrenzendem Knochengewebe) aus dem Knochen gesägt. Sie beinhalteten jeweils ein PL- und ein Ti-Implantat (Abb. 7). Von den resultierenden Knochenblöcken wurden Röntgenbilder (Makroradiographien) in zwei Achsen angefertigt und auf Zeichen von Sklerose und Osteolyse unmittelbar in der Nähe der Implantate überprüft. Folgend wurden die Proben in 4%iger Formalinlösung für eine Woche fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 – 100 %) entwässert und in Xylol für 4 Tage unter Vakuum entfettet.

Histologien für nicht dekalzifizierten Knochen: Die Proben wurden für 7 Tage in monomerem Kunstharz (MMA-Methylmethacrylat, HistoDur®, Leica) unter Vakuum infiltriert. Das flüssige Kunstharz wurde in speziellen Teflonformen im Wasserbad bei 30°C zur Polymerisation gebracht [24-27]. Die nun in den Kunstharzblöcken enthaltenen Knochenproben wurden auf halber Länge des Stiftes quer zu ihm unterteilt (Exakt Bandsäge, Exakt GmbH Deutschland). Von

dem proximalen Teil wurden Schnitte längs zum Stift und von dem distalen Teil solche quer zum Stift geführt (Abb. 8).

Dickschnitte: In jeder Schnittorientierung wurde ein Dickschnitt (300 µm) mittels einer Innenlochsäge (Leica® SP 1600, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) gesägt.

Mikroradiographien: Von den Dickschnitten wurden vor dem Aufkleben auf einen halbtransparenten Objektträger Mikroradiographien angefertigt (Faxitron x-ray systems, Hewlett Packard, Oregon, USA. Bestrahlung: 27kV für 11 Sekunden). Die Mikroradiographien der Dickschnitte ermöglichten die Darstellung röntgendichter Strukturen im Gewebe. Mit dieser Methode erhält man eine Aussage über den Kalzifizierungsgrad der Knochenmatrix nahe am Implantat, welcher bei neu gebildetem Knochen als Qualitätsmerkmal von großem Interesse ist. Diese Fragestellung kann mit histologischen Färbemethoden nicht qualitativ beantwortet werden. Somit stellt die Mikroradiographie eine wertvolle Ergänzung zu der histologischen Untersuchung dar.

Dünnschnitte: Mit einem Hartschnittmikrotom (Leica® RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden von allen PLA-Implantaten Dünnschnitte (6 µm) in beiden Ebenen angefertigt. Von den Titanimplantaten konnte nur exemplarisch 12 Dünnschnitt gemacht werden (pro Zeitintervall 6 Schnitte) da die Anfertigung erheblich Schwierigkeiten bereitete. Die Ursache dafür ist, dass das Mikrotom nicht in der Lage ist Metall zu schneiden. Der Titananteil musste vorher entfernt werden um von den Proben Dünnschnitte anfertigen zu können. Dies gelang indem mit der Innenlochsäge eine Scheibe von 1 mm Dicke geschnitten wurde. Das Implantat konnte dann vorsichtig von der Unterseite her herausgedrückt werden. Das eingebettete Knochengewebe verblieb dabei im Schnitt. Die Scheibe konnte nun wieder mittels Acrylkleber auf einen Träger befestigt und mit dem Mikrotom geschnitten werden.

Färbung: Abschliessend wurden die Dickschnitte mit Toluidin Blau gefärbt und die Dünnschnitte zudem nach Van Kossa/ McNeal gefärbt. Die Dickschnitte gaben Informationen über die Morphologie des Knochens. Die Dünnschnitte dienten der Beurteilung der zellulären Reaktion auf das Implantat.

Auswertung der Histologie: Die histologischen Schnitte wurden formatfüllend mittels einem mit Digitalkamera (Leica® DC180, Leica® Microsystems, Glattbrugg, Schweiz) versehenen Makroskop (Leica® M420) fotografiert und archiviert (Leica®, IM 1000®). Eine spezielle Software (Leica, QWin®) diente zur quantitativen, objektiven Bewertung der Veränderung der Knochendichte in den Dickschnitten. Für die sogenannte Histomorphometrie wurde in den Längsschnitten das Knochengewebe um das Implantat zentrifugal in drei gleich grosse Sektoren eingeteilt (Abb. 9).

Sektor 1 befindet sich direkt am Implantat, Sektor 2 schließt daran und Sektor 3 ist der äußerste Bereich. Sie wurden in einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe® Photoshop® 7.0) von Hand in drei Farben (rot, gelb, grün) eingefärbt. Die Knochendichte ergibt sich aus der gemessenen Fläche an Knochengewebe in Relation zu der Gesamtfläche des entsprechenden Sektors. Um Fehldetektionen ähnlicher Farbbereiche im restlichen Schnitt zu vermeiden, wurden nicht zu detektierende Bereiche schwarz gefärbt. Das Bild eines Implantates wurde in seine beiden Hälften geteilt. Jede Hälfte wurde als eigenständige Probe ausgewertet. Vermessen wurden Bilder, die in Lokalisationen mit überwiegend spongiösem Anteil der Knochenmatrix lagen. Nicht alle Proben waren ausreichend groß, um in den periphersten Sektor 3 hineinzureichen. Nur teilweise gefüllte Sektoren wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Osteoklasten, Fremdkörperriesenzellen und Lymphozyten wurden semiquantitativ in den Dünnschnitten bewertet. Dazu wurde ein Score System verwendet (Tab. 2), welches Aufschluß auf die Entzündungsreaktion im benachbarten Gewebe liefern konnte.

Statistik: Die Daten der Histomorphometrie wurden statistisch mit einer Varianzanalyse (ANOVA) untersucht (StatView 4.5®, Abacus Inc., Berkeley, Kalifornien), wodurch die Unterschiede der Knochendichte zwischen den Implantattypen, den Zeitintervallen und den 3 Sektoren untereinander extrapoliert werden konnten. Ein P-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

4 Resultate

4.1 DIE OPERATION

Während und nach der Operation traten keine Komplikationen auf. Nur in zwei Fällen rutschte ein Titanimplantat in die Knochenmarkshöhle als die Verschlusskappe aufgeschraubt wurde. Offensichtlich war die Verankerung durch den Ultraschallprozess nicht ausreichend gewesen, vermutlich weil die Titanimplantate mit zuviel Kraft einbracht worden waren. Diese Implantate wurden aus der Studie entfernt und durch neue Implantate in einem neuen Bohrloch ersetzt. Die Handhabung des Ultraschallgerätes war weitgehend problemlos, obwohl es im Vergleich zur Größe der Implantate deutlich überdimensioniert war. Das Einbringen der Stifte geschah nach den Anweisungen des Entwicklungsteams der WoodWelding AG und ging nach einigen Vorversuchen an Kadaverknochen leicht von der Hand. Alle PLA-Implantate konnten korrekt und auf Anhieb mit festem Sitz im Knochen implantiert werden. Es wurde darauf geachtet, dass der Einbringprozess so kurz wie möglich gehalten wurde, um die thermische Belastung des Gewebes minimal zu halten. Innerhalb weniger Sekunden war das oberflächlich aufgeschmolzene Polylaktid wieder fest. Nach der Insertion wurde mit der Entfernung des Ultraschallgerätes für 1-2 Sekunden gewartet, bis die Kerntemperatur des Stiftes unter die Glasübergangstemperatur des Polymers gesunken war, um das dadurch noch etwas weiche Implantat nicht zu gefährden. Nach einer Minute war der Stift in seinem endgültigen Zustand gefestigt. Der herausstehende Teil des Stiftes wurde mit einem Seitenschneider abgetrennt. Das Einbringen des Titanstiftes ging genauso einfach wie beim reinen PLA-Implantat. Jedoch musste danach das Adapterstück zwischen Ultraschallgerät und Implantat mit einem Spezialinstrument (Schraubenzieher) entfernt werden. Das offene Innengewinde des Implantates wurde durch eine Verschlusschraube verschlossen. Der besondere Schraubenzieher und die geringe Größe der Schraube erforderte einiges Fingerspitzengefühl des Operateurs.

4.2 RADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

In den Röntgenbildern, die in der Aufwachphase der Operation angefertigt wurden, zeigte sich, dass die Implantate an den vorgesehenen Stellen waren. Der Knochen war ohne Risse. Reflektion und Streuung der Röntgenstrahlen an den Titanimplantaten ließ die detaillierte Darstellung der Kontaktfläche Knochen-Implantat jedoch nicht zu.

4.3 MAKORADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Nach Versuchsende (2 und 6 Monate) wurden die Knochen dem Schlachtkörper entnommen und *in toto* geröntgt. Durch das fehlende Weichgewebe und den geringeren Abstand von Objekt und Film erhielt man wesentlich schärfere und kontrastreichere Bilder. Nach Versuchsende befanden sich alle Implantate nach wie vor an den vorgesehenen Positionen.

Anhand der Makroradiographien der gesägten Blöcke mit den Implantatpaaren (PLA- und Titanimplantat) konnten schon erste Aussagen über das Integrationsverhalten gemacht werden. Veränderungen an der Knochendichte um die Implantate waren im kortikalen wie im spongiösen Knochen zu beobachten. Deutlich sichtbar hatte sich um die Implantate im spongiösen Knochenbereich nach 2 Monaten Versuchsdauer ein röntgendichter Saum von ca. 0,5 mm gebildet (Abb. 10). Nach 6 Monaten war dieser verstärkt sichtbar. Im kortikalen Knochen waren Areale mit leicht verminderter und erhöhter Röntgendichte miteinander vermischt. Nur bei einem PL-Implantat (1504-2, 6 Monate-Gruppe) zeigte sich ein deutlich weniger röntgendichter, ringförmiger Bereich um das Implantat (Abb. 11). Zwei Titanimplantate (1502-2, 1506-3) waren zu tief implantiert worden und sind so in die Knochenmarkhöhle geschoben worden. Sie waren nach Versuchsende an der ursprünglichen Implantationsstelle an der gleichen Position wie direkt nach der Operation nachweisbar.

4.4 MAKROSKOPISCHE EVALUATION

Am entnommenen Knochen konnten die Implantatköpfe leicht durch Palpation lokalisiert werden. Die Stifte zeigten dabei einen festen Sitz. Nachdem das darüber liegende Bindegewebe entfernt wurde, waren sie gut durch das Periost sichtbar. Titan und PLA-Implantate waren dabei gut von einander unterscheidbar (Abb. 7) .

Zeichen von Entzündung, wie z.B. eine Rötung und Schwellung, waren im umliegenden und bedeckenden Gewebe des Implantatkopfes nicht feststellbar. Bei der Präparation der Proben wurde darauf geachtet das Periost zu erhalten, um diese wichtige Schicht für das Knochenwachstum histologisch betrachten zu können.

4.5 HISTOLOGISCH-MORPHOLOGISCHE EVALUATION

In allen histologischen Schnitten wurde Umbau und Neubildung von Knochen gefunden.

Neu gebildeter Knochen ist in der Toluidinblau-Färbung dunkler. Ein deutlicher Unterschied bestand zwischen dem spongiösen und dem kortikalen Knochen in dem Verhältnis von Knochenumbau und -aufbau. Der Spalt zwischen dem kleineren Durchmesser des Titanimplantates und des Bohrloches war bereits nach 2 Monaten bindegewebsfrei mit kalzifiziertem Geflechtknochen gefüllt. Dabei war direkter Kontakt von Knochenmatrix und Implantat nachweisbar. Winzige Spalten zwischen Implantat und Gewebe konnte anhand des kongruenten Oberflächenverlaufes als Präparationsartefakte identifizieren werden.

Im Zuge der histologischen Probenaufbereitung hatte sich das Polymer der Implantate teilweise im Xylol und Einbettmedium gelöst. Trotzdem konnte die ursprüngliche Form des Implantates anhand des fixierten, anliegenden Gewebes leicht bestimmt werden. Hier hinterließen Zellen und zelluläre Matrix eine scharfkantige, durchgehende Linie, die die Oberfläche des Implantates schlüssig repräsentierte.

Entsprechend den Makroradiographien, dominierte im spongiösen Knochen eine

Zubildung von Knochengewebe, die einen räumlich begrenzten Saum um das Implantat formte. Von 2 auf 6 Monate hat sich der Saum zu einer lückenlosen Knochenlamelle verstärkt.

In kortikalen Lokalisationen dominierte ein Umbau rund um das Implantat. Er zeigt sich im histologischen Schnitt als kleine, regelmäßig verteilte Kavitäten in der angrenzenden Kortikalis. Nur in einem der Schnitte (1504-2) konnte Knochenresorption beobachtet werden, welche über die physiologische Reaktion auf das Bohrtrauma hinausgeht.

4.5.1 PLA-IMPLANTAT

Auf repräsentative Bilder an spongiösen (Abb. 12, 13, 14, 15) und kortikalen Lokalisationen (Abb. 16, 17, 18, 19) sei eingangs hingewiesen.

Das PLA-Implantat blieb bei der Implantation vollständig intakt. Auch das Abtrennen des überstehenden Stiftendes führte zu keiner Beschädigung. Während des Implantationsprozesses drückte sich das im Kontakt mit dem Knochen aufgeschmolzene Material in die Poren des spongiösen Knochens, bzw. in die Struktur des Gewindes im kortikalen Knochen. Ein Teil des Materials hatte sich bei der Insertion an dem Rand des Bohrloches abgestreift und war als "Schmelzkappe" auf dem Periost verblieben respektive entlang der periostalen Wand des Knochens geflossen (Abb. 20).

Die Grenzen zwischen Polymer und Gewebe waren anhand der geradlinigen Formation von Zellen und Knochenmatrix gut erkennbar. Die Oberfläche der Implantate zeigte häufig eine orangenhautähnliche Struktur. In einigen Schnitten war die oberflächliche Schicht des Materials eingefaltet oder eingerollt. Dies war bei 2 Monaten wie bei 6 Monaten zu beobachten. (Abb. 21, 22).

Nach 2 monatiger Implantation konnten keine Zeichen von Degradation und Fragmentation am Implantat festgestellt werden. Erst nach 6 Monaten waren die ersten, sehr kleinen Risse in wenigen oberflächlichen Bereichen des Stiftes festzustellen.

Im Vergleich der Längsschnitte von PLA-Implantaten fällt beim Zeitpunkt von 6 Monaten auf, dass sich die Knochenlamelle nicht nur verstärkt hat,

sondern in Richtung Implantat viele kleine Ausläufer von Knochensubstanz gebildet haben, die sehr spitz zulaufen und eine füßchenartige Form haben. Bei genauerem Vergleich zeigte sich von 2 auf 6 Monate ein leicht verringerter Implantatdurchmesser.

Die periostale Reaktion auf die bereits erwähnte PLA-Kappe aus dem Implantationsprozess resultierte nicht in einer vermehrten Kallusbildung. Zu einem Einwachsen von Bindegewebe zwischen Implantat und Knochen kam es nur in einem Fall. Es beschränkte sich jedoch auf den oberen Millimeter des Stiftes. Im spongiösen Knochen hatte sich das Knochengewebe von 2 nach 6 Monaten von einem Knochensaum zu einer richtigen Knochenlamelle entwickelt. Auffällig war eine Formation an dem PLA-Implantat in kortikalen Lokalisationen. Sie kann als keil- bzw. trichterförmige Zone beschrieben werden, deren Breite von proximal nach distal entlang des Stiftes abnimmt (Abb. 20). In dreidimensionaler Betrachtung entspricht dies einem Kegel. In dieser Zone hat der Knochen eine deutlich erhöhte Porosität, die durch regelmäßig verteilte Löcher in der Knochenmatrix gekennzeichnet ist. Die obere Breite des Keiles entsprach überwiegend der Ausdehnung der PLA-Kappe, die von überschüssig aufgeschmolzenem Material an der Knochenoberfläche gebildet wird.

4.5.2 TITANIMPLANTAT

Auf repräsentative Bilder an spongiösen (Abb. 23, 24, 25, 26) und kortikalen Lokalisationen (Abb. 27, 28, 29, 30) sei eingangs hingewiesen.

Der mit PLA-Streifen beschichtete Titanstift blieb erwartungsgemäß unbeeinflusst vom Implantationsprozess. Das Polymer gewährte eine feste Verankerung im Bohrloch. Nur in zwei Fällen rutschte das Implantat beim Aufschrauben der Schutzkappe in die Markhöhle. Durch die verschiedenen Schnittachsen konnte das Verhalten von Titanoberfläche-Gewebe und PLA-Gewebe studiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass neuer Knochen bereits nach 2 Monaten bis an und entlang der vom Polymer unbedeckten Titanoberfläche herangewachsen war. Der ursprünglich vorhandene 0.1mm breite Spalt war in allen Proben mit Knochensubstanz gefüllt und kaum mehr erkennbar (Abb. 31).

Die Reaktion des Periosts glich dem der PLA-Implantate. Da die Titanimplantate einen geringeren Überstand über die Knochenoberfläche haben und keine Schmelzkappe hatten, war der Implantatkopf fortgeschrittener überwachsen. Die beiden PLA-Streifen des Implantates waren bei allen Implantaten intakt, d.h. sowohl mit dem Titanstift wie auch mit dem Knochengewebe verbunden. Es konnte keine Fragmentation oder Resorption des Kunststoffanteils beobachtet werden.

Der Knochenaufbau am Implantat in spongiösen Lokalisationen glich dem bei den PLA-Implantaten. Mehr noch erschien die entstandene Knochenlamelle stärker als bei dem reinen Polymerstift.

Im kortikalen Knochen trat das bei den PLA-Implantaten beschriebene Phänomen eines Umbaukegels nicht oder in bedeutend schwächerer Ausprägung auf. Zudem hatte die Umbauzone weniger eine kegel- als eine zylindrische Form (Abb. 32).

4.5.3 HISTOMORPHOMETRISCHE EVALUATION

Die Methode digitale Bilder der Histologien „von Hand“ einzufärben hat sich als sehr präzise und effizient herausgestellt. Das menschliche Auge ist der Auswertungssoftware im Identifizieren relevanter Strukturen weit überlegen. Zudem verfügt die Software nicht über die Werkzeuge das Bild in identisch große Sektoren zu vermessen, wie es in Photoshop möglich ist.

Der methodische Aufwand wurde nur dort betrieben, wo sich eine quantitative Unterscheidung des Knochenumbaus sinnvoll erfassen ließ. So wurden die rein kortikalen Lokalisationen nicht histomorphometrisch ausgewertet, da die Umbauzonen mit ihren kleinen und regelmäßig verteilten „Löchern“ sich nicht im Zusammenhang mit der Nähe zum Implantat zeigten. Das Ausmaß der durch die Löcher entstandene Porosität erschien als zu gering um die Integrationsqualität der Implantate in Frage zu stellen.

Bei der Auswertung der Querschnitte stellte sich heraus, dass deren Schnittebene zu weit distal gewählt worden war um vergleichbare Bilder zu erhalten. Die Proben der kortikalen Lokalisationen hatten auf dieser Ebene keine, und viele Proben der spongiösen Lokalisationen nur unzureichende Mengen

spongiösen Knochen.

Die Ergebnisse und der Probenumfang der histomorphometrischen Evaluation sind in Tab. 3, 4 und Tab. 5 aufgeführt. Die Analyse der Variablen (ANOVA) ergab folgende Ergebnisse:

Im Vergleich der beiden Implantattypen haben sich keine signifikanten Unterschiede gezeigt. Man kann jedoch von einem starken Trend zu einer höheren Knochendichte beim Titanimplantat sprechen ($p = 0.056$).

Von 2 auf 6 Monaten Versuchsintervall hat sich die Knochendichte signifikant verringert ($p=0.016$). Dieses Ergebnis ist zusammen mit dem histologischen Bild zu diskutieren.

Zwischen den drei Sektoren rund um das Implantat hat sich gezeigt, dass *Sektor 1* mehr Knochen beinhaltet als *Sektor 2* ($p=0.0003$) und noch mehr als *Sektor 3* ($p=0.0037$). Zwischen *Sektor 2* und *Sektor 3* bestand kein signifikanter Unterschied.

4.5.4 MIKORADIOGRAPHISCHE EVALUATION

Im direkten Vergleich zu den Histologien konnte bei allen Dickschnitten eine Übereinstimmung von röntgendichten und histologisch gefärbten (Toluidin Blau) Knochenstrukturen festgestellt werden (Abb. 33). Kleine Abweichungen ergaben sich, da in der Histologie wenige Mikrometer der Oberfläche gefärbt wurden, auf den Mikroradiographien jedoch die röntgendichten Strukturen des gesamten Dickschnittes abgebildet werden. Auf eine gesonderte Evaluation der Mikroradiographien wurde deshalb verzichtet.

4.6 HISTOLOGISCH-ZELLULÄRE EVALUATION

Ergebnisse der semiquantitativen Analyse sind in Tab. 6 und Tab. 7. dargestellt. In wenigen Dünnschnitten gingen Teile des Implantat-Knochen-Grenzgewebes im Zuge des histologischen Färbeprozesses verloren. Nach dem Herauslösen von Polymer und Einbettmedium war die Haftung des Gewebes auf dem Objektträger an diesen Stellen unzureichend. Ein Verlust von Gewebe und die Bildung von

Artefakten konnte bei dieser Methode nicht absolut ausgeschlossen werden. Von den Titanimplantaten konnte keine repräsentative Anzahl von Schnitten angefertigt werden. Die wenigen vorhandenen Schnitte glichen denen der PLA-Implantate im histologischen Bild.

In den Dünnschnitten zeigte sich deutlicher als bei den Dickschnitten, wie sich das Polymer in die Hohlräume des spongiösen Knochens gedrückt hatte. Wie schon in den Dickschnitten, erschien die Oberfläche der Implantate unverändert und glatt. Das Gewebe lag dem Implantat nahtlos an. Bei zwei Implantaten zeigte sich, dass sogar Osteoblasten in die mikroskopischen Risse und Spalten im Polymer eingewandert waren. Es wurde insgesamt ein normales histologisches Bild des Knochens vorgefunden. Bei beiden Implantattypen, sowohl bei spongiösem wie auch bei kortikalem Knochen, konnten keine Zeichen einer Entzündung oder Fremdkörperreaktion gefunden werden. Das Spektrum der vorgefundenen Zelltypen wurde von aktiven Osteoblasten, deren Vorläuferzellen und mesenchymalen Zellen dominiert. Die Osteoblasten lagen palisadenartig angeordnet auf der Oberfläche von neu aufgebautem Osteoid. Im Osteoid und dem darunter liegenden Geflechtknochen waren regelmäßig verteilte Osteozyten zu finden. Physiologischerweise sind sie in weit geringerer Anzahl als die Osteoblasten vorhanden. Osteoklasten waren nur sehr selten zu finden und konzentrierten sich auf den Bereich des periostalen Knochenaufbaues. Nur in einem Fall konnte ein Osteoklast auf halber Länge eines PLA-Implantates nachgewiesen werden. Typische Entzündungszellen wurden kaum gefunden. Einzig mehrkernige Riesenzellen wurden vereinzelt direkt am Polymer aufliegend angetroffen (maximal 8 Zellen pro komplett ausgewertetem Schnitt) (Abb. 34). Auch Makrophagen und mononukleäre Zellen waren Einzelfunde. Diese Zellen fanden sich im Weichgewebe rund um das Implantat (Abb. 35). Nach 6 monatiger Versuchsdauer zeigte sich nahezu das gleiche Bild wie bei 2 Monaten. Osteoklasten wurden jedoch in Periostnähe vermehrt angetroffen. Dabei kann immer noch von einer geringen Anzahl gesprochen werden. Zusätzlich lagen mehr vielkernige Riesenzellen dem Polylaktid auf (maximal 5 Zellen im vollständig analysierten Schnitt). Bei einer Probe (1504-2) der 6-

Monate-Gruppe war in dem Dickschnitt ein Bereich am obersten Teil eines PLA-Implantates aufgefallen, in dem sich Knochensubstanz zurückgebildet hatte. Anstatt mit Knochenmatrix waren sie mit Weichgewebe gefüllt. Diese Areale stellten sich im Dünnschnitt bei starker Vergrößerung als Einsprossung von Bindegewebe heraus. Das Gewebe lag in einem relativ lockeren und homogenen Verband vor, dessen Faserverlauf erkennbar dem Periost entsprang. Das Bindegewebe wies keine Verdichtung an der Grenze zu Knochen oder Implantat auf. Es konnten am angrenzenden Knochen keine Zeichen einer fortschreitenden Resorption (in Form von Osteoklasten) oder eines Knochenaufbaues (Osteoblasten, die einem Osteoidsaum aufliegen) gefunden werden. Die in der keilförmigen Zone vorgefundenen Löcher des kortikalen Knochens stellten sich bei näherer Betrachtung als Osteone mit großlumigem Havers'schem Kanal heraus [28]. Die Kanalwand war von Osteoblasten bedeckt, die einem Osteoidsaum aufsaßen. Der Innenraum selber war mit lockerem Bindegewebe gefüllt.

5 Diskussion

5.1 ZIEL DER STUDIE

Mittels dieser Studie konnten belegt werden, dass die BoneWelding® Technologie geeignet ist Implantate aus thermoplastischem Polymer (PLDLA) unschädlich im Knochen zu verankern. Die Verflüssigung der des Polymers via Ultraschall-Applikation zeigte keine Schädigung des Knochengewebes. Weiterhin hat sich die Möglichkeit diese Technologie in Kombination mit einem Titanimplantat anzuwenden ebenfalls bewährt.

5.2 VERSUCHSMODELL

Die Röhrenknochen der Hintergliedmaße des Schafes haben sich erneut als gutes Tiermodell für die Untersuchung von Implantaten für die Knochenchirurgie bewiesen [29–31].

Sowohl die Proportionen wie auch die Knochenstruktur und der Heilungsablauf sind dem Menschen sehr ähnlich [32–34]. Zudem ist das Schaf eine gut domestizierte Spezies, deren einfacher Umgang der Betreuung im Projekt sehr entgegenkommt.

5.3 CHIRURGISCHES VORGEHEN

Die Operation verlief bei allen 6 Tieren reibungslos. Der Zugang zu den Implantationsorten, distaler Femur und proximale Tibia, war für den Chirurgen gut zu bewerkstelligen. Der Zugang von medial ist ohne aufwendige Präparation und Spezialinstrumentarium möglich, da der Knochen wie beim Hund unmittelbar unter der Haut zu finden ist [35]. So konnten die Implantate an den vorgesehenen Stellen gesetzt werden. Selbst die beiden Titanimplantate, welche in die Knochenmarkshöhle rutschten, konnte durch ein neues in vergleichbarer Position ersetzt werden.

Besondere Erwähnung muss die Handhabung der Implantationstechnik an dieser Stelle finden. Dabei handelt es sich um ein völlig neuartiges Verfahren

mit einer eigenen Dynamik. Das mit dem Implantat bestückte Ultraschallgerät brauchte nur auf das vorgebohrte Loch im Knochen aufgesetzt werden. Sobald die Ultraschallenergie aktiviert wurde glitt das Implantat unter leichtestem Druck mühelos in das Loch.

Obwohl der Prototyp des Ultraschallgerätes mit den Dimensionen eines Akkuschraubers vergleichsweise unhandlich war, stieß die einfache Anwendung bei den Chirurgen auf große Zustimmung. Für den klinischen Gebrauch sollte allerdings das Ultraschallgerät noch weiter entwickelt und vor allem die Handlichkeit verbessert werden. Die Entwicklungsarbeit des Industriepartners hat während des Versuchszeitraumes bereits ein Ultraschallgerät in der Größe eines Dentalbohrerhandstückes hervorgebracht. Mit diesem sollen Stifte von bis zu 2.1 mm Durchmesser verwendet werden können.

5.4 RADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Das postoperative Röntgen der operierten Gliedmaße hat sich wie erwartet bewährt, um den Operationserfolg zeitnah zu überprüfen. Die Implantate waren in korrekter Lokalisation und Orientierung darstellbar. Risse im Knochen, die bei der Bohrung entstehen können, früh zu erkennen ist außerordentlich wichtig. Bei mechanischer Belastung ergeben sich aus ihnen leicht Frakturen des ganzen Knochens. Diese Gefahr bestand nach keiner Operation in dieser Studie.

5.5 MAKORADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Nachdem die Implantate makroskopisch aufgefunden werden konnten, wurden die vier Lokalisationen als Blöcke aus dem Knochen gesägt. Deren Radiographien, längs und quer zur Knochenoberfläche, ergaben ein präzises Bild von der Lage der Implantate im Knochen, was zur Definition der Schnittachsen für die Histologie von Bedeutung war. Dieses Vorgehen hat sich bei den verhältnismäßig kleinen Implantaten als unabdingbar herausgestellt. Zusätzlich ließ sich die Röntgendichte des Knochens am Implantat beurteilen. Die Röntgendichte entspricht direkt dem Vorkommen von kalzifiziertem

Knochengewebe. Nur dieser „reife“ Knochen bietet eine hohe mechanische Festigkeit. Proben mit auffällig höherer oder niedriger Röntgendichte am Implantat konnten daher schon im Voraus für eine detaillierte Betrachtung in der Histologie vorgemerkt werden. Die Resorptionszone des einen PLA-Implantates war bereits in diesen Aufnahmen zu erkennen. Alle übrigen Implantate zeigten schon hier eine gute Integration im Knochen. Die Makroradiographien haben somit nützliche Vorabinformationen geliefert.

5.6 MAKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die Beurteilung des an- und umliegenden Bindegewebes an den Implantationsorten ergab keine besonderen Befunde. Das Fehlen von Entzündung, Wucherungen oder Nekrosen ist ein erstes Kriterium für die biologische Verträglichkeit von Implantat und Implantationstechnik. Sicher muss bei den Resultaten berücksichtigt werden, dass die Begutachtung erstmals 2 Monate nach der Operation erfolgte, so dass die ersten Gewebereaktionen, die alleine durch das chirurgische Trauma hervorgerufen wurden, bereits wieder abgeklungen waren.

Eine mangelhafte Biokompatibilität der Implantate oder der Insertionstechnik wäre auch noch nach dieser Implantationszeit anhand von makroskopischen Gewebsreaktionen, wie Rötungen oder verstärkter Fibrosierung erkennbar gewesen [29]. Zudem sind von den verwendeten Materialien bislang keine Wirkungen dieser Art bekannt.

5.7 PROBENAUFBEREITUNG UND EVALUATION

Die Aufbereitung der Proben für die Histologie ist für unser Labor eine standardisierte Methode, die normalerweise keine Probleme bereitet. Jedoch erfordert das Schneiden der Proben bei so kleinen Implantaten ein sehr präzises Vorgehen um den maximalen Durchmesser in der Achse des Stiftes zu treffen. Ein Fehlschnitt ist durch den Abtrag des Sägeblattes nicht wiederholbar und bedeutet den Verlust der Probe. Die Durchsichtigkeit des Einbettungsmaterials

erleichterte in diesem Falle die richtige Schnittführung, so dass keine Probe in dieser Studie verloren ging.

5.8 HISTOLOGISCHE-MORPHOLOGISCHE EVALUATION

5.8.1 AM PLA-IMPLANTAT

Es entstand ein kreisförmiger Wall von aufgeschmolzenem PLA über der proximalen Knochenkortex, welcher sich bei der Insertion nicht in das Bohrloch und die angrenzenden Hohlräume drücken ließ. Dieser Effekt hat sich bereits in den Vorversuchen gezeigt und kann die Folge eines „überdimensionierten“ Implantates oder zu starkem Druck durch den Chirurgen auf das Implantat während der Insertion sein. Zusätzlich spielt sicher auch die Beschaffenheit des Knochens direkt am Implantationsort eine größere Rolle. Mit den unterschiedlichen Porositäten der Implantationsorte ergibt sich auch ein unterschiedlicher Materialbedarf, den man befriedigen wollte. Dass sich bei Lokalisationen mit geringerer Porosität ein gewisser Materialüberschuss an der Knochenoberfläche ergibt, wurde in dieser ersten Tierstudie bewusst in Kauf genommen. Die damit einhergehende größere Wärmeübertragung auf das Gewebe stellt die maximal mögliche Belastung dieser Methode dar. Dieser Gesichtspunkt darf bei der Interpretation der ohnehin guten Ergebnisse nicht vergessen werden. In der klinischen Anwendung, wie sie heute z.B. in der maxillo-facialen Chirurgie erfolgt, wird mittels eines Stufenbohrers ein gezieltes Aufbohren der Kortikalis auf einen vergrößerten Durchmesser erreicht und so ein periostaler Materialüberschuss vollständig vermieden, ohne damit die Stabilität des Implantates zu vermindern [36]. Die Resultate der beiden Hauptlokalisationen unterschieden sich deutlich voneinander, weshalb sie folgend separat diskutiert werden.

5.8.1.1 IM SPONGIÖSEN KNOCHEN

Der Schwerpunkt dieser Studie war auf die Reaktion des spongiösen Knochens in Bezug auf die eingeschmolzenen Implantate gelegt. Die Hälfte der Implantate wurde deshalb in spongiösen Knochenbereichen platziert. Weitere 10 Prozent

der Proben fanden sich im Uebergangsbereich zwischen spongiösem und kortikalem Knochen. Die schwammartige Struktur der Spongiosa wird ständig umgebaut, so daß die komplexen Zug-, Druck- und Scherkräfte bei minimalem Materialeinsatz optimal aufgenommen werden können. Der spongiöse Knochen hat mit seinen Hohlräumen zwischen den Trabekeln einen geringeren Anteil an Knochensubstanz. Die Hohlräume sind mit einem losen Verband von lockerem Bindegewebe, Fettzellen und mesenchymalen Vorläuferzellen gefüllt [37]. In diese relativ poröse Knochenstruktur kann das aufgeschmolzene Polymer bis zu 1mm tief eindringen, wobei es sich den Knochenbalken anlegt. So entsteht eine ausgedehnte Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat, welche die mechanische Belastung gleichmäßig verteilt. Implantate, die mit dieser Technologie verankert wurden, können dadurch zwei bis dreimal größere Kräfte aufnehmen als vergleichbar dimensionierte Schrauben [6, 23].

Die Ergebnisse der Histologie belegen, dass der spongiöse Knochen den Implantationsprozess gut überstanden hat und das Implantat nach 2 und 6 Monaten bestens integriert. Nach 2 Monaten war nahezu die gesamte Oberfläche des Implantats von einem Knochensaum bedeckt. Viele Osteoblasten saßen im Bereich um das Implantat pallisadenförmig einem Osteoidsaum auf, was ein eindeutiges Zeichen für einen regen Knochenaufbau ist. Vier (4) Monate später, bzw. 6 Monate nach der Implantation, hatte sich die Stärke des Knochensaums mehr als verdoppelt und umschloss das Implantat lückenlos als kräftige Lamelle. Im Vergleich zum vorhergehenden Zeitintervall ließ die Aufbauaktivität jedoch bereits wieder nach. Dennoch zeigte sich der Knochen strukturierter als zuvor, was eine erhöhte Stabilität des Implantates im Knochen folgern lässt.

Sowohl die eingekerbte, orangenhautähnliche Oberfläche wie auch das aufgefaltete und eingerollte Material sind mit hoher Wahrscheinlichkeit bei dem Implantationsprozesses entstanden. Wenn die oberste Schicht Polymer durch die Ultraschallenergie und den Kontakt mit dem Knochen aufschmilzt und das Implantat in das Bohrloch geschoben wird, drückt sich die flüssige Masse in die Hohlräume des Knochens. Sobald das Polymer abkühlt und nur noch zähflüssig ist wird es sich im Kontakt mit Knochenstrukturen lediglich verschieben. Daraus

ergeben sich aufgefaltete bis eingerollte PLA-Formationen. Eine Verbindung des aufgeschmolzenen Materials mit dem soliden Kern des Implantates bleibt möglich, solange es noch formbar bleibt. Somit sind höchstwahrscheinlich viele der Einkerbungen in der Oberfläche aus einer Auffaltung oder Einrollung entstanden (Abb. 36).

Die ausgeprägte Ausbildung von knöchernen Füßchen am Implantat und einem verringerten Implantatdurchmesser nach 6 monatiger Versuchzeit ist durch die geringfügig unterschiedliche Probenbearbeitung zu erklären. Bei 6 Monaten war die Ebene der Querschnitte im Mittel weiter distal geführt als bei den Proben des 2 monatigen Versuchszeitraums (Abb. 37, 38). Wie sich in der parallel durchgeführten Studie zur mechanischen Festigkeit an künstlichem Knochen zeigte, hat das ursprünglich zylindrische Implantat nach der Implantation eine Kegelform. Dies ist durch den Umstand bedingt, dass die Implantatspitze die ganze Strecke bis zum Bohrlochende zurücklegt und am längsten dem Schmelzprozess ausgesetzt ist. Dabei verliert sie unweigerlich am meisten Material ins Gewebe. Die Implantatspitze hat ab einem bestimmten Punkt keinen Kontakt mehr zum Bohrlochrand. Die Schnittebene bei 2 Monaten ist genau an oder oberhalb dieses Punktes und bei 6 Monaten tendenziell unterhalb der Verjüngungsstelle. Der Spalt unterhalb der Verjüngungsstelle konnte innerhalb von 6 Monaten überbrückt werden und der Knochen in jede Unebenheit der Polymeroberfläche einwachsen.

Da es sich hierbei nicht um eine quantifizierbare Beobachtung handelt, ist zu berücksichtigen, dass das mineralisierte Knochengewebe die Oberfläche des Polymers in der Mikroradiographie und der Toluidin Blau Färbung zudem viel stärker und zuverlässiger kontrastiert als Weichgewebe an einem vorhergehenden Zeitpunkt. Dadurch würde eine gekerbte Oberfläche viel weniger auffällig sein als eine mit Knochen bewachsene.

Als eine weitere Interpretationsmöglichkeit ist denkbar, daß der verminderte Implantatdurchmesser und die in das PLA-Material gewachsenen Füßchen eine Folge von PLA-Degradation waren. In diesem Fall müßte der Abbau des Kunststoffes bereits soweit zurückliegen, daß das Polymer schon durch

Knochensubstanz ersetzt wurde und Knochen in die spät entstandenen Spalten eingewachsen wäre. Jedoch beginnt der Abbau dieses PLA-Typs erst bei ca. 6 Monaten [38–40]. So erscheint es unwahrscheinlich, dass die Degradation zu diesem Zeitpunkt soweit fortgeschritten war, dass solch ein Durchmesserunterschied zustande käme (Abb. 38).

5.8.1.2 IM KORTIKALEN KNOCHEN

Ein bedeutender Teil chirurgischer Fälle betrifft kortikalen Knochen, beispielsweise Frakturen der großen Röhrenknochen. Aus diesem Grund war es ebenfalls interessant zu erforschen, wie die Verträglichkeit der BoneWelding® Technologie und der Implantate in diesem Knochentyp ist. Kortikaler Knochen besitzt im Gegensatz zu der Spongiosa normalerweise keine Hohlräume, weshalb er auch als kompakter Knochen bezeichnet wird. Deshalb war es nötig vor der Implantation eine Struktur zu schaffen, in die sich der aufgeschmolzene Polymer verankern kann. Dies wurde mittels eines geschnittenen Gewindes erreicht. Für diese Fragestellung wurden 25% der Implantate vorgesehen. Zusätzlich waren ca. 15% der Proben im Übergangsbereich zwischen spongiösem und kortikalem Knochen überwiegend von kortikaler Qualität. Die Histologien zeigten auch in den kortikalen Lokalisationen Zeichen intensiver Umbauvorgänge. Strukturen, wie die beschriebenen Löcher, werden auch im Zusammenhang mit einem Trauma wie der Bohrung des Loches beschrieben [41–44].

Demnach weicht der Mechanismus der Knochenheilung im kortikalen Knochen von jenem im spongiösen Knochen ab. Dabei wird als erster Schritt ein Teil des Knochens durch Osteoklastenresorption abgebaut um Raum für die Umstrukturierung zu geben. Auffällig war jedoch die keilförmige Erscheinung des Umbaues direkt im Eintrittsgebiet des Implantates. Diese Form ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es bleibt fraglich, ob proximal mehr Knochen durch das Bohrtrauma oder die thermische Belastung geschädigt wurde. Zudem könnte sich die Vaskularisierung durch die direkt darüber liegende Schmelzkappe des Polymers schlechter entwickelt haben, wodurch mehr kortikaler Knochen resorbiert wurde.

Diese Fragen sollten in weiteren Studien ergründet werden, jedoch scheint alles in allem dieses Phänomen die Biokompatibilität der Materialien und der Methode nicht in Frage zu stellen. Der kortikale Knochen weist keinen bedeutenden Substanzverlust auf und hat einen guten Kontakt zum Implantat. Zusätzlich zeigt der Vergleich von dem 2 zum 6 monatigen Intervall eine Beruhigung des Umbaues mit einer starken Tendenz zum Knochenaufbau.

5.8.2 AM TITANIMPLANTAT

Die gute Osseointegration der Titanimplantate gleicht im spongiösen Knochen sehr dem der PLA-Implantate. Das Konzept der Kombination des Polymers mit einem Titanstift kann somit schon als erfolgreich bezeichnet werden.

Auch im kortikalen Knochen verhält es sich ähnlich wie beim PLA-Implantat, jedoch war die Umbauzone mehr zylindrisch und eine Keilform deutete sich nur bei wenigen Implantaten an. Insgesamt war die Umbauzone viel schwächer ausgeprägt.

An den Titanimplantaten gab es so gut wie keine Schmelzkappe und einen geringeren Umbau. Es liegt nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der Größe der Schmelzkappe, bzw. der Menge des aufgeschmolzenen Materials und der Reaktion des darunter liegenden Gewebe besteht. Denkbar ist eine stärkere Beeinträchtigung der Nährstoffversorgung durch die geringere Periostauflage direkt am Implantat wie auch eine größere Wärmebelastung durch das Aufschmelzen von mehr Polymer.

Bemerkenswert ist zudem, dass der Spalt von 0,1 mm zwischen Titankern und Bohrlochrand ausnahmslos bindegewebfrei von Knochensubstanz überbrückt, bzw. gefüllt wurde.

5.8.3 HISTOMORPHOMETRISCH-STATISTISCHE EVALUATION

Die quantitative Auswertung von histologischen Schnitten dient der Untermauerung von Beobachtungen, die beim intensiven Studieren der Schnitte gemacht werden.

Die quantitative Auswertung der spongiösen Längsschnitte konnte einige interessante Zusammenhänge zeigen, die sich schlüssig im biologischen Kontext interpretieren lassen. So überrascht eine signifikant höhere Knochendichte in der Nähe des Titan- im Verhältnis zum PLA-Implantat wenig. Titan hat unter den Biomaterialien mit die besten Eigenschaften in Sachen Biokompatibilität, was in einem stärkeren oder schnelleren Knochenaufbau seinen Ausdruck finden kann. Der niedrigere Anteil an Knochensubstanz im Sektor 1 von 2 auf 6 Monate Versuchszeitraum kann sich durch eine anfängliche Zubildung von Geflechtknochen mit hohem Volumen erklärt werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf wurde er durch eine geringere Menge gut strukturiertem und festeren Knochen ersetzt. Quantität wird durch Qualität ersetzt und resultiert in einer verringerten Knochendichte im direkt am Implantat angrenzenden Sektor 1. Diese Dynamik ist als physiologischer Heilungsprozess beim Knochen bekannt [45]. Dies kann als ein Indikator für die hohe Biokompatibilität und erfolgreiche Osseointegration der Implantate interpretiert werden. Die Ergebnisse der statistischen Analyse der 3 Sektoren untereinander bestätigten klar die Beobachtung einer starken Knochenlamelle, welche die Implantate in allen histologischen Schnitten umgab. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte nicht vergessen werden, daß sie auf zweidimensionalen Daten basieren. Sie können daher den Knochengehalt der dreidimensionalen Probe sowohl über- wie auch unterrepräsentieren.

5.9 HISTOLOGISCH-ZELLULÄRE EVALUATION

In den Dünnschnitten konnte die zelluläre Ebene der Reaktion auf die Implantate studiert werden. Mittels dieser Methode konnte das Bild einer bereits weitgehend erfolgten und noch fortschreitenden Einheilung der Implantate im Knochen bestätigt und genauer belegt werden.

Bei beiden Implantattypen reagierte der Organismus zu beiden Zeitpunkten ohne Entzündungsreaktion – es konnten keine erwähnenswerte Anzahl an Entzündungszellen festgestellt werden. Das erhöhte Vorkommen von Osteoklasten ist mit der geringen Anzahl insgesamt und der Konzentrierung auf den Kallusbereich am Implantatkopf als eine physiologische Folge der

verstärkten Knochenumbauaktivität zu werten. Die bei 6 Monaten erhöhte, aber immer noch sehr geringe Anzahl vielkerniger Riesenzellen direkt am Polylaktid wird als ein Ausdruck erhöhter Degradation des Polylaktids angesehen. Die Bildung einer bindegewebigen Membran oder Kapsel konnte bei keinem Implantat beobachtet werden. Damit schließt das histologische Bild eine Fremdkörperreaktion auf die Implantate und deren Implantationsmethode aus [46–48]. Bindegewebe kam zwischen Implantat und Knochen nur in einem Fall vor. Für eine Reaktion auf ein Trauma, das 6 Monate zurück liegt ist die geringe Ausdehnung der Knochenresorption, die Struktur des Bindegewebes und des Knochengewebes ungewöhnlich. Es wäre zu erwarten, dass entweder das Bindegewebe oder der Knochen eine Wachstumstendenz zeigt. Somit kann angenommen werden, dass dieser Einzelfall keine generelle Unverträglichkeitsreaktion auf Implantat und Implantationsmethode war, sondern eine Resorption des Knochens, welcher durch ein Reparationsgewebe ersetzt wurde. Dieses Phänomen ist bei heilenden Frakturspalten häufiger zu beobachten [43]. Bei den Löchern im kortikalen Knochen an den Implantaten handelt es sich mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit um Umbaueinheiten. Charakteristisch für diese funktionale Einheit ist eine tropfenähnliche Form im Längsschnitt. Am vorderen Pol wird Knochensubstanz durch Osteoklasten resorbiert. Ihnen folgen Osteoblasten, die wieder Knochen aufbauen und den Hohlraum bis auf einen dünnen Kanal einengen. Sie liegen in großer Anzahl dem neuen Knochen (Osteoid) auf, welcher immer weiter kalzifiziert. Zahlenmäßig sind Osteoklasten geringer vertreten, weshalb sie je nach Schnittebene nicht immer sichtbar sind. Das Innere des Hohlraumes ist von einem losen Verband von Knochenmarksgewebe und Kapillaren ausgefüllt [28, 49]. Der Auf- und Abbau steht im gesunden Knochen im Gleichgewicht und bewirkt eine ständige Anpassung der Knochenstruktur an die mechanisch-funktionelle Situation. Wird der Knochen geschädigt, wie bei einem Bruch oder einer Bohrung, ist es nötig zum einen schneller als gewöhnlich umzubauen und zudem den Verlust an Stabilität zu kompensieren. Der erhöhte Umbau zeigt sich typischerweise anhand von vielen Umbaueinheiten, die das Bild der frühen temporären

Porosität verursachen [43].

Eine Zubildung von Knochengewebe innerhalb der kompakten Matrix ist im Vergleich zum spongiösen Knochen mangels Hohlräumen nicht möglich. Die Bestrebung des Gewebes die Stabilität zu erhöhen ist daher nur durch eine Verdickung der Kortikalis zu erreichen. Diese Reaktion konnte bei beiden Implantattypen auf peri- und endostaler Seite beobachtet werden.

5.10 GESAMTURTEIL

In dieser Studie konnte die biologische Verträglichkeit der BoneWelding® Technologie nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen zeigten ein gutes Einwachsen beider Implantattypen in den Knochen. Die neuartige Implantationsmethode entfaltet ihr Potential im spongiösem Knochen ideal. In dieser Knochenform kann der Aufschmelzprozess des Kunststoffs einen besonders guten Formschluss mit dem Knochengewebe herstellen. Die gute Osseointegration der Implantate lässt auf vergleichbar gute mechanische Haltekräfte schließen, wie sie in den Vorversuchen gemessen wurden. Die Überprüfung des mechanischen Aspektes in dem vorliegenden Tierexperiment wurde als verfrüht eingestuft um ihr für die erforderlich höhere Probenanzahl weitere Tiere und Mittel zu opfern.

In dieser Studie konnte die Ursache für die kegelförmige Umbauzone an den Polylaktid-Implantaten im kortikalen Knochen nicht hinreichend geklärt werden. Aufschluß darüber werden weiterführende Studien erbringen, die für den Einsatz der BoneWelding® Technologie in verschiedenen chirurgischen Einsatzfeldern in Vorbereitung sind. Mechanische Tests sollen dabei als zusätzliche Auswertungsmethoden eingeschlossen werden

5.11 PERSPEKTIVEN

Eine weitere Verbesserung des Einwachsverhaltens ist durch Anpassung des Implantatdesigns und Polymereinsatzes (Menge) für genau definierte Anwendungszwecke und Implantationsorte zu erreichen.

Die Verbesserung der Handhabbarkeit des Ultraschallgeräts wird es den

Chirurgen erleichtern ein optimales Operationsergebnis zu erzielen. Zusammenfassend hat die BoneWelding® Technologie ein großes Potential als Plattformtechnologie für den Einsatz im ganzen Skelett. Sie eröffnet völlig neue Designkonzepte für Implantate und damit einhergehend neue Operationsmethoden. Somit wird es in vielen Bereichen der Knochenchirurgie möglich sein herkömmliche, auf Schraubung basierende Methoden zu ersetzen. Die besondere Eignung der Methode für poröse Knochenstrukturen prädestiniert sie für den Einsatz im Kiefer und in osteoporotischen Knochen.

6 Literaturverzeichnis

1. Becker, W., et al., *Osteoporosis and implant failure: an exploratory case-control study*. J Periodontol, 2000. 71(4): p. 625-631.
2. Kim, W.Y., et al., *Failure of intertrochanteric fracture fixation with a dynamic hip screw in relation to pre-operative fracture stability and osteoporosis*. Int Orthop, 2001. 25(6): p. 360-362.
3. Soshi, S., et al., *An experimental study on transpedicular screw fixation in relation to osteoporosis of the lumbar spine*. Spine, 1991. 16(11): p. 1335-1341.
4. Lanyon, L. and Skerry, T., *Postmenopausal osteoporosis as a failure of bone's adaptation to functional loading: a hypothesis*. J Bone Miner Res, 2001. 16(11): p. 1937-1947.
5. Ferguson Stephen J, et al., *BoneWelding®: Thermal and Mechanical Characterisation of the Bone / Polymer Interface*. Poster presentation on 12th Annual Meeting, European Orthopaedic Research Society, Lausanne Switzerland, 2002.
6. Meyer, D.C., et al., *Ultrasonically implanted PLA suture anchors are stable in osteopenic bone*. Clin Orthop Relat Res, 2006. 442: p. 143-148.
7. Benington, I.C., et al., *Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation*. Clin. Oral Impl. Res., 2002. 13: p. 293-297.
8. Haurowitz, F., *Eiweissdenaturierung*. Hoppe, Seyler, Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch- chemischen Analyse, 1966. 4(1): p. 450ff.
9. Lundskog, J., *Heat and bone tissue. An experimental investigation of the thermal properties of bone and threshold levels for thermal injury*. Scand J Plast Reconstr Surg, 1972. 9: p. 1-80.
10. Li, S., et al., *Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts*. J Orthop Res, 1999. 17(6): p. 891-899.
11. Gutwald, R., et al., *Bioresorbable implants in maxillo-facial osteosynthesis: experimental and clinical experience*. Injury, 2002. 33 Suppl 2: p. B4-16.
12. Liu, J. and Liu, Y., *[Preparation and application of polylactide]*. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2001. 18(2): p. 285-287, 295.
13. Piskin, E., *Biodegradable polymeric matrices for bioartificial implants*. Int J Artif Organs, 2002. 25(5): p. 434-440.
14. Prokop, A., et al., *A comparative radiological assessment of polylactide pins over 3 years in vivo*. Biomaterials, 2005. 26(19): p. 4129-4138.
15. Rokkanen, P., et al., *Absorbable devices in the fixation of fractures*. J Trauma, 1996. 40(3 Suppl): p. S123-127.
16. Heidemann, W., et al., *Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo*. Biomaterials, 2001. 22(17): p. 2371-2381.

17. Bostman, O. and Pihlajamäki, H., *Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review*. Biomaterials, 2000. 21(24): p. 2615-2621.
18. Han, C.-h., et al., *Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants*. Clin Oral Implants Res, 1998. 9(1): p. 1-10.
19. Cordioli, G., et al., *Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2000. 15(5): p. 668-674.
20. Triplett, R.G., et al., *Implant materials, design, and surface topographies: their influence on osseointegration of dental implants*. J Long Term Eff Med Implants, 2003. 13(6): p. 485-501.
21. Turvey, T.A., et al., *Self-reinforced biodegradable screw fixation compared with titanium screw fixation in mandibular advancement*. J Oral Maxillofac Surg, 2006. 64(1): p. 40-46.
22. Sykaras, N., et al., *Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2000. 15(5): p. 675-690.
23. Ferguson, S.J., et al., *Enhancing the mechanical integrity of the implant-bone interface with BoneWelding technology: determination of quasi-static interfacial strength and fatigue resistance*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006. 77(1): p. 13-20.
24. Donath, K., *The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (Sage-Schliff (sawing and grinding) technique)*. Pathol Res Pract, 1985. 179(6): p. 631-633.
25. Engelhardt, P. and Gasser, J.A., *LEICA HistoDur a resin specifically designed for the histology of mineralized tissues*. Leica applications brief, Sandoz Pharma Ltd., Osteoporosis Research, 4002 Basel, Switzerland, 1995.
26. Hahn, M., et al., *Undecalcified preparation of bone tissue: report of technical experience and development of new methods*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1991. 418(1): p. 1-7.
27. Hutzschenreuter, P. and Brummer, H., *Embedding, cutting and grinding methods to produce undecalcified cortical bone sections over the whole bone*. Acta Anat (Basel), 1984. 118(4): p. 201-204.
28. Liebig, H.-G., *Funktionelle Histologie*. Schattauer, Stuttgart, 1993.
29. Oberle, A., et al., *[Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep]*. Schweiz Arch Tierheilkd, 2005. 147(11): p. 482-490.
30. Sturmer, K.M. and Schuchardt, W., *[New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing (author's transl)]*. Unfallheilkunde, 1980. 83(7): p. 341-345.
31. Theiss, F., et al., *Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement*. Biomaterials, 2005. 26(21): p. 4383-4394.

32. Aerssens, J., et al., *Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research*. Endocrinology, 1998. 139(2): p. 663-670.
33. Nunamaker, D. and Perren, S., *Experimental models of fracture repair*. Clin Orthop, 1998. 355: p. 56-65.
34. Wissing, H., et al., *Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen*. Unfallheilkunde, 1990. 212: p. 479-488.
35. Piermattei, D.L. and Donald, L., *Piermattei - An Atlas of Surgical Approaches to the Bone and Joints of the Dog and Cat*. W.B. Saunders Company, 1993.
36. KLS Martin Group, T., *SonicWeld Rx - Die neue Ära der kraniofazialen Osteosynthese*. Prospekt, 2005.
37. Ross, M., et al., *Atlas der Histologie*. Ullstein Mosby, Berlin, 1995. 2. Auflage.
38. Suuronen, R., et al., *A 5-year in vitro and in vivo study of the biodegradation of polylactide plates*. J Oral Maxillofac Surg, 1998. 56(5): p. 604-614; discussion 614-605.
39. Mainil-Varlet, P., et al., *Long-term in vivo degradation and bone reaction to various polylactides. I. One-year results*. Biomaterials, 1997. 18(3): p. 257-266.
40. Piskin, E., *Biodegradable polymers as biomaterials*. J Biomater Sci Polym Ed, 1995. 6(9): p. 775-795.
41. Heidemann, W., et al., *Analysis of the osseous/metal interface of drill free screws and self-tapping screws*. J Craniomaxillofac Surg, 2001. 29(2): p. 69-74.
42. Lewandrowski, K.U., et al., *Use of the Er:YAG laser for improved plating in maxillofacial surgery: comparison of bone healing in laser and drill osteotomies*. Lasers Surg Med, 1996. 19(1): p. 40-45.
43. Perren, S.M., *Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology*. J Bone Joint Surg Br, 2002. 84(8): p. 1093-1110.
44. Weinans, H., et al., *Quantitative analysis of bone reactions to relative motions at implant-bone interfaces*. J Biomech, 1993. 26(11): p. 1271-1281.
45. Wolff, J., *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Verlag von August Hirschwald, Berlin, 1892.
46. Bergsma, E.J., et al., *Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures*. J Oral Maxillofac Surg, 1993. 51(6): p. 666-670.
47. Hoffmann, R., et al., *[Local foreign body reactions to biodegradable implants. A classification]*. Unfallchirurg, 1997. 100(8): p. 658-666.
48. Donath, K., et al., *The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol,

1992. 420(2): p. 131-137.

49. Hall, M., *The locomotor system. Functional histology*. Carles C Thomas, Springfield Illinois USA, 1965.

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tab. 1: Verteilung der Implantate über die Lokalisationen im Knochen

Tier		1801	1802	1806	1803	1804	1805
† nach...		2 Monaten	2 Monaten	2 Monaten	6 Monaten	6 Monaten	6 Monaten
Lokalisation	1	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL
		PL	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL	Ti-PL
	2	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL
		PL	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL	Ti-PL
	3	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL
		PL	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL	Ti-PL
	4	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL
		PL	Ti-PL	PL	Ti-PL	PL	Ti-PL
					Ti-PL	Titanium-Polymer-Stift	
					PL	reiner Polymerstift	

TAB. 2: Makroskopische Evaluation

2 Monate

<i>Schaf</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Rötung</i>
1501	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
1502	1	-
	2	+/-
	3	-
	4	-
1506	1	-
	2	-
	3	-
	4	-

6 Monate

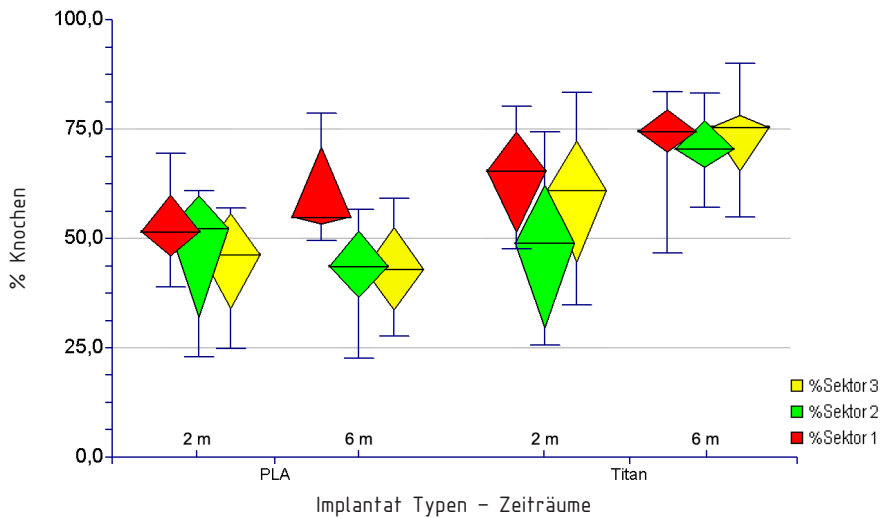
<i>Schaf</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Rötung</i>
1503	1	+/-
	2	-
	3	-
	4	-
1504	1	-
	2	+/-
	3	-
	4	-
1505	1	-
	2	-
	3	+/-
	4	-

TAB. 3: Histomorphometrischen Auswertung, Probenumfang

Implantat	2 Monate	6 Monate	Total
PLA	8 von 24	14 von 24	22 von 48
Titan	10 von 24	16 von 24	28 von 48

TAB. 4: Histomorphometrische Auswertung, Mittelwerte und Box Plot

Implantat	Zeitraum	% Sektor 1	Std. Abw.	% Sektor 2	Std. Abw.	% Sektor 3	Std. Abw.
PLA	2m	53	10	48	15	45	13
	6m	47	10	46	7	48	10
Titan	2m	64	12	48	16	59	17
	6m	60	10	43	10	43	10



TAB. 5: Ergebnisse der histomorphometrischen Evaluation

Implantat	Zeitraum	Schaf	Probe	Seite	% Sektor 1	% Sektor 2	% Sektor 3
PLA	2m	1501	1	links	60,15	60,13	53,43
				rechts	69,47	58,54	55,32
PLA	2m	1502	1	links	45,52	45,25	37,01
				rechts	48,60	60,90	56,99
PLA	2m	1506	1	links	38,94	27,52	
				rechts	54,80	22,89	24,81
PLA	2m	1506	2	links	47,69	53,91	39,58
				rechts	59,62	51,14	
PLA	6m	1503	1	links	47,45	37,79	29,92
				rechts	47,51	42,64	54,11
PLA	6m	1503	2	links	54,98	43,69	49,25
PLA	6m	1503	3	links	53,71	45,86	44,27
				rechts	58,50	56,96	41,27
PLA	6m	1504	1	links	51,84	45,61	
				rechts	42,10	32,08	38,31
PLA	6m	1504	2	links	30,49	58,20	
				rechts	21,70	49,35	52,00
PLA	6m	1505	1	links			
				rechts	51,77	54,57	65,01
PLA	6m	1505	2	links	48,81	47,52	52,85
				rechts	49,66	45,45	52,67

Implantat	Zeitraum	Schaf	Probe	Seite	% Sektor 1	% Sektor 2	% Sektor 3
Titan	2m	1501	1	links	69,91	56,27	
				rechts	73,30	74,39	83,31
Titan	2m	1502	1	links	61,28	28,35	
				rechts	51,95	43,79	34,83
Titan	2m	1502	2	links	60,57	46,06	61,25
				rechts	71,21	62,21	61,11
Titan	2m	1506	1	links	50,10	29,93	
				rechts	47,61	25,55	
Titan	2m	1506	2	links	80,18	52,17	
				rechts	77,66	62,26	54,26
Titan	6m	1503	1	links	73,74	53,58	45,12
				rechts	69,86	53,76	54,53
Titan	6m	1503	2	links	78,63	51,07	
				rechts	76,34	56,59	59,17
Titan	6m	1504	1	links	49,57	33,97	31,45
				rechts	49,86	37,36	41,90
Titan	6m	1504	2	links	54,36	42,82	44,27
				rechts	54,35	41,82	56,69
Titan	6m	1504	3	links	54,31	44,82	37,91
				rechts			
Titan	6m	1505	1	links	55,47	37,45	36,80
				rechts	50,27	45,59	
Titan	6m	1505	2	links	56,54	22,58	27,61
				rechts	54,53	31,70	32,73
Titan	6m	1505	3	links			
				rechts	62,23	48,64	46,31

TAB. 6: Zelluläre Evaluation der PLA-Implantate

2 Monate

<i>Schaf</i>	<i>No.</i>	<i>Schnittebene</i>	<i>Rundzellen</i>	<i>Osteoklasten</i>	<i>multinucl. Riesenzellen</i>
1501	1	längs	-	-	-
		quer	-	-	-
	2	längs	-	++	-
		quer	-	-	-
	3	längs	-	-	-
		quer	-	-	-
	4	längs	+	+++	-
		quer	-	-	-
1502	1	längs	-	-	-
		quer	-	-	-
	2	längs	++	-	-
		quer	+	-	-
	3	längs	-	++	-
		quer	-	-	-
	4	längs	-	-	-
		quer	-	-	-
1506	1	längs	-	-	-
		quer	+	-	-
	2	längs	-	-	+
		quer	-	-	-
	3	längs	-	-	-
		quer	-	-	-
	4	längs	-	-	-
		quer	-	-	-

- = 0

+ = 1-3

++ = 4-6

+++ = 7-9 Zellen im Schnitt

6 Monate

<i>Schaf</i>	<i>No.</i>	<i>Schnittebene</i>	<i>Rundzellen</i>	<i>Osteoklasten</i>	<i>multinucl. Riesenzellen</i>
1503	1	längs	-	+	+
		quer	-	+	+
	2	längs	++	+	+++
		quer	-	-	+
	3	längs	-	+	++
		quer	-	+	+
	4	längs	-	+	++
		quer	-	-	-
1504	1	längs	-	-	-
		quer	-	-	+
	2	längs	-	++	++
		quer	-	+	++
	3	längs	-	-	-
		quer	-	-	++
	4	längs	-	++	+
		quer	-	-	-
1505	1	längs	-	+	+
		quer	-	-	-
	2	längs	-	-	-
		quer	-	-	+
	3	längs	-	+	+
		quer	-	-	-
	4	längs	-	++	+
		quer	-	-	+

- = 0

+ = 1-3

++ = 4-6

+++ = 7-9 Zellen im Schnitt

TAB. 7: Zelluläre Evaluation der Titan-Implantate

2 Monate

<i>Schaf</i>	<i>No.</i>	<i>Schnittebene</i>	<i>Rundzellen</i>	<i>Osteoklasten</i>	<i>multinucl. Riesenzellen</i>
1501	1	längs	-	-	-
		quer			
	2	längs			
		quer			
	3	längs	-	-	-
		quer			
	4	längs			
		quer			
1502	1	längs			
		quer	-	-	++
	2	längs			
		quer	+	-	+
	3	längs			
		quer	-	-	+
	4	längs			
		quer			
1506	1	längs			
		quer			
	2	längs	-	+	-
		quer	-	+	+
	3	längs			
		quer			
	4	längs			
		quer			

6 Monate

<i>Schaf</i>	<i>No.</i>	<i>Schnittebene</i>	<i>Rundzellen</i>	<i>Osteoklasten</i>	<i>multinucl. Riesenzellen</i>
1503	1	längs	-	++	-
		quer			
	2	längs	-		-
		quer			
	3	längs			
		quer	-	-	-
	4	längs	-	-	-
		quer			
1504	1	längs			
		quer	-	-	-
	2	längs			
		quer	-	-	-
	3	längs			
		quer	-	-	-
	4	längs			
		quer			
1505	1	längs			
		quer			
	2	längs			
		quer			
	3	längs			
		quer			
	4	längs			
		quer			

	auswertbare Schnitte
--	----------------------

7.2 Abbildungen



Abb. 1: PLA-Implantate



Abb. 2: Das Titanimplantat besteht aus einem Titanzylinder mit 2 seitlichen PLA-Streifen



Abb. 3: Ultraschallgerät bestehend aus Steuerungseinheit, Handstück und Sonotrodenspitze



Abb. 4: Befestigung des Implantates in der Sonotrodenspitze und Implantation in den Knochen

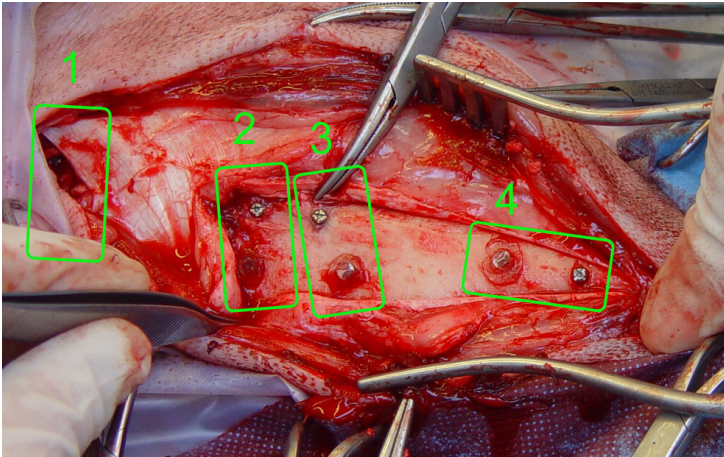


Abb. 5: Lage der Implantate und deren Lokalisationen, (1: Femur, 2-4: Tibia), intraoperativ

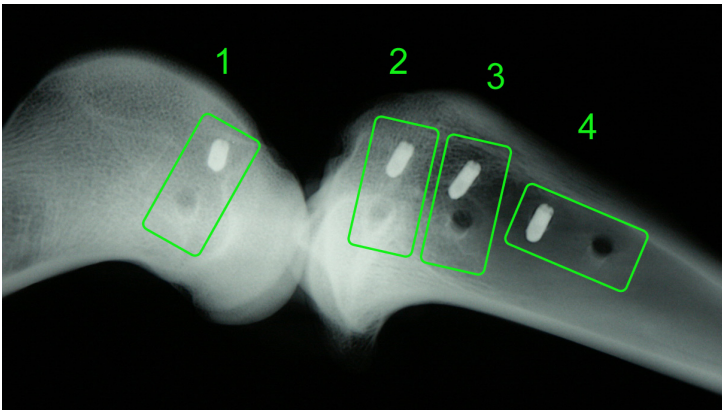


Abb. 6: Radiologische Kontrolle der Lage und Orientierung der Implantate im Knochen, nach der Entnahme. Lokalisationen wie in Abb. 5

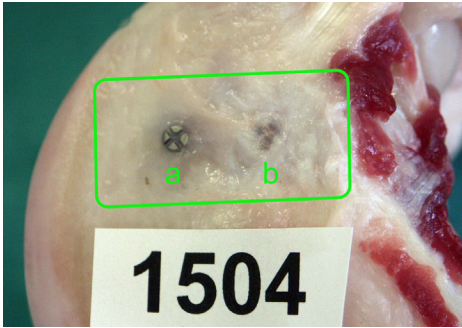


Abb. 7: Makroskopische Beurteilung der Implantationsorte auf Entzündungszeichen (a: Titanimplantat, b: PLA-Implantat).

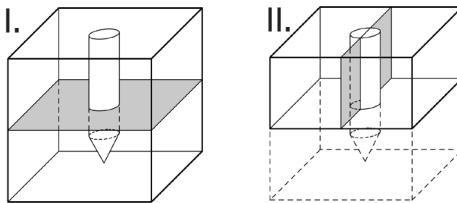


Abb. 8: Schnittebenen der Histologie.

I.: Querschnitt. Die Schnittebene wurde auf halber Länge des Implantates geführt.
II.: Längsschnitt. Der obere Teil des Implantates wurde erneut eingebettet und längs zur Implantatachse an der Stelle des maximalen Durchmessers geschnitten.

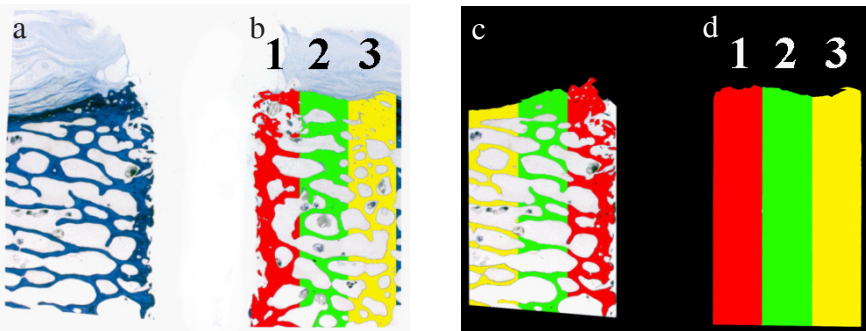


Abb. 9: Aufbereitung der Histologischen Bilder für die Histomorphometrie
Von dem Bild der mit Toluidin Blau gefärbten Schnittes ausgehend (a), wurden die Knochenstrukturen innerhalb der drei Sektoren (1-3) von Hand eingefärbt (b). Bereiche ausserhalb des Knochens wurden ausblendet um Fehldetektionen zu vermeiden (c). Zur Berechnung des Knochenanteils im einzelnen Sektor mussten zusätzlich die Totalflächen gemessen werden (d).

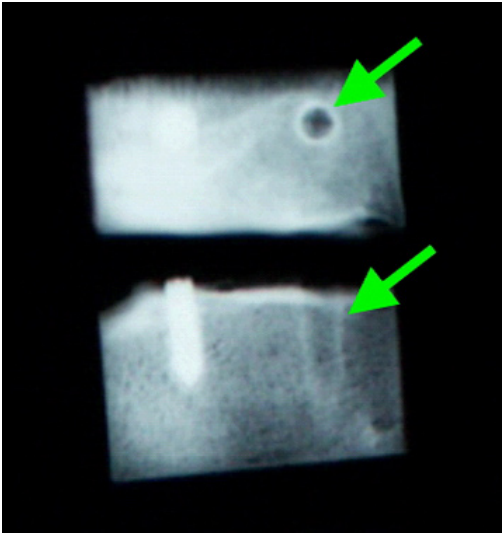


Abb. 10: Die Makroradiographie längs und quer zur Implantatachse zeigt ein reguläres Bild der Implantate mit einem röntgendichten Saum (Pfeil). Probe 1503 Position 2, nach 6 Monaten Implantationszeitraum

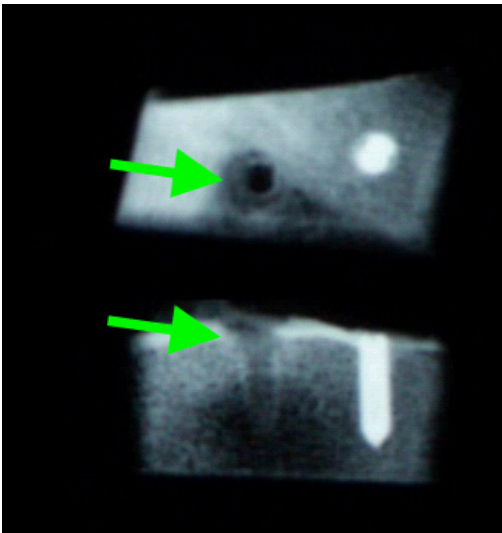


Abb. 11: Hier ist die einzige Probe mit deutlicher Resorptionszone abgebildet (Pfeil). Probe 1504, Position 2, nach 6 Monaten Implantationszeitraum

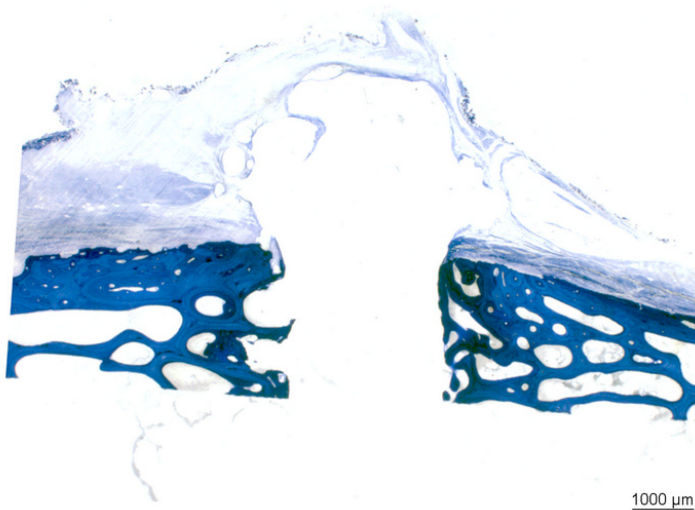


Abb. 12: PLA 2 Monate, Längsschnitt

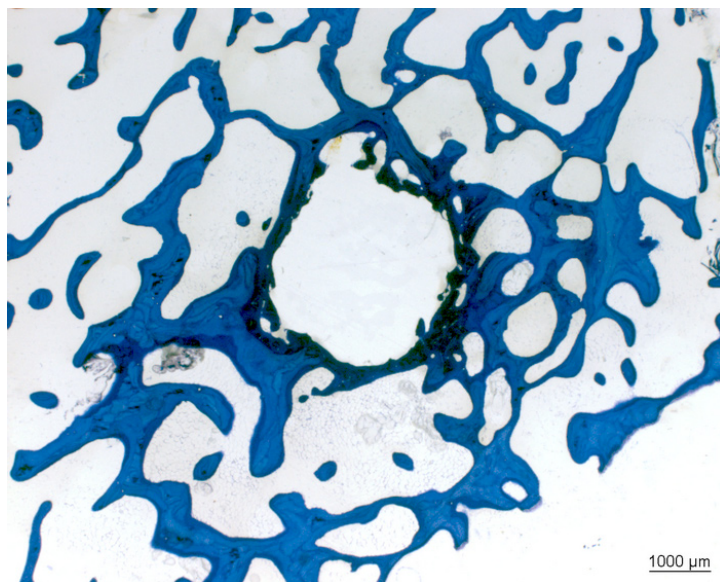


Abb. 13: PLA 2 Monate, Querschnitt

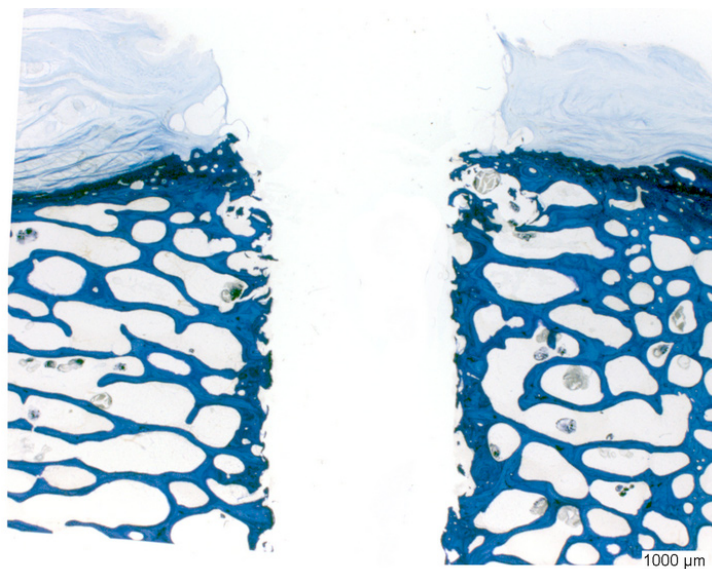


Abb. 14: PLA 6 Monate, Längsschnitt

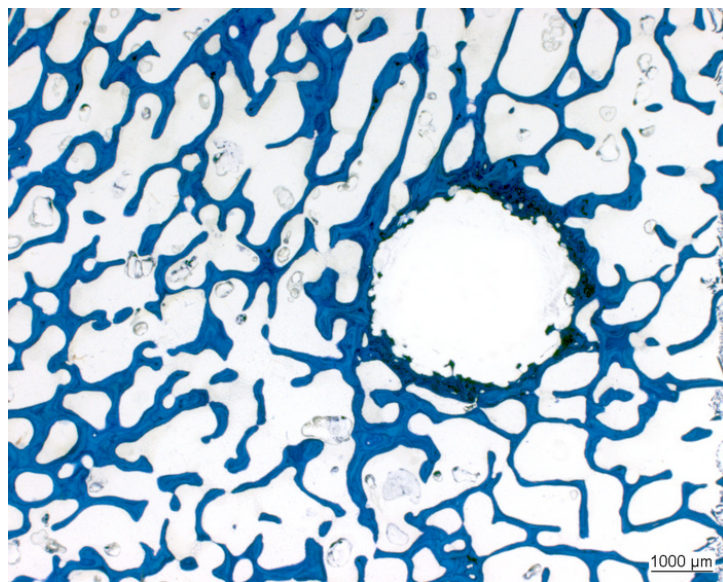


Abb. 15: PLA 6 Monate, Querschnitt

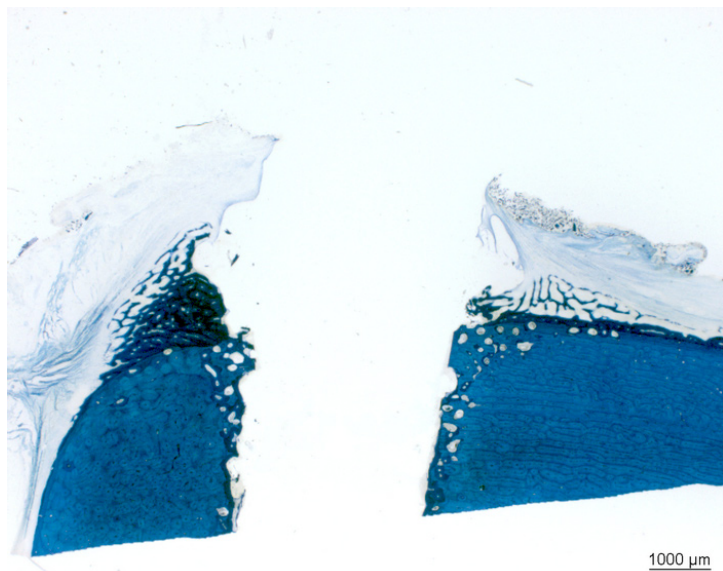


Abb. 16: PLA 2 Monate, Längsschnitt

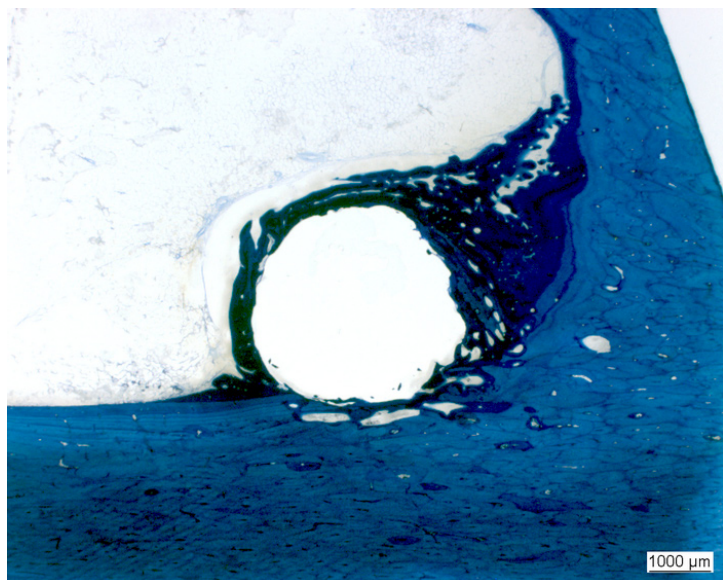


Abb. 17: PLA 2 Monate, Querschnitt

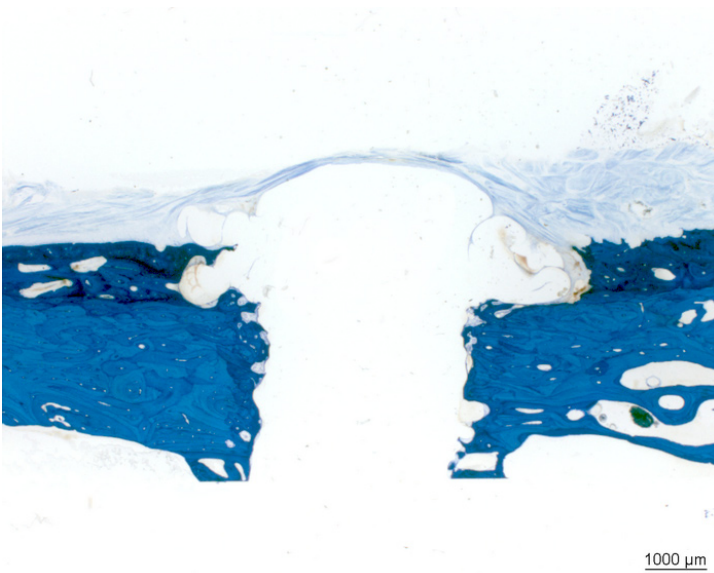


Abb. 18: PLA 6 Monate, Längsschnitt

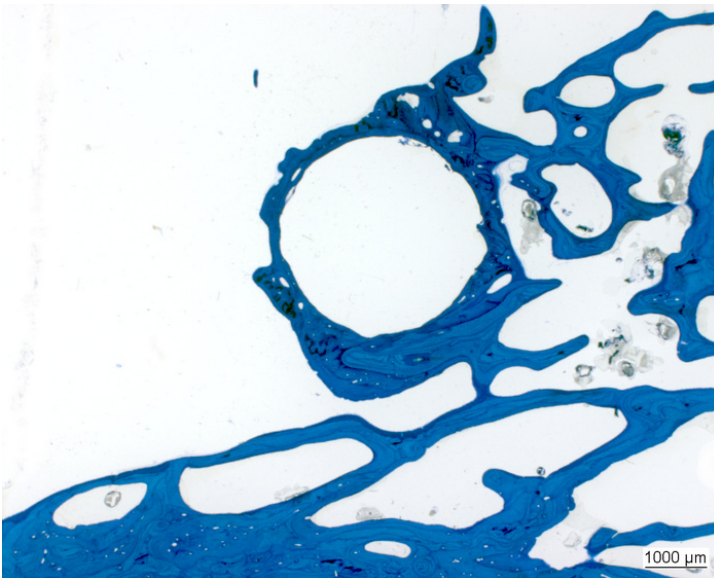


Abb. 19: PLA 6 Monate, Querschnitt

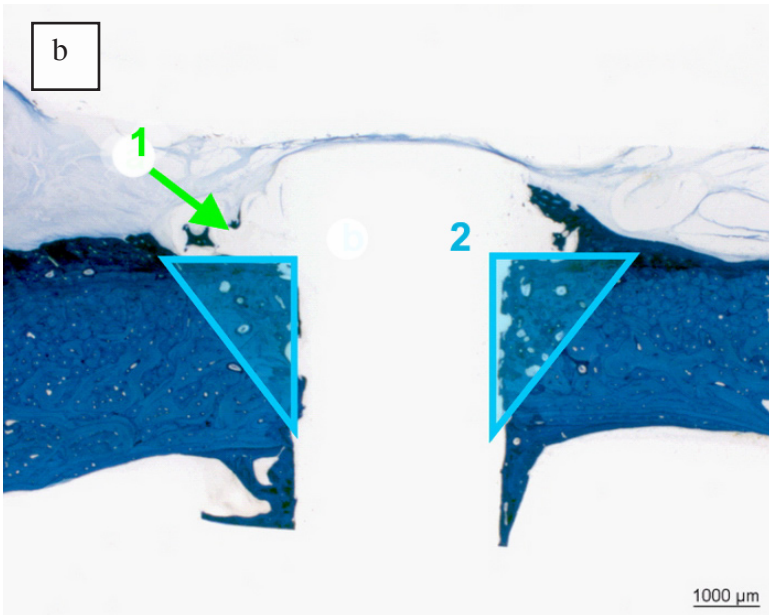
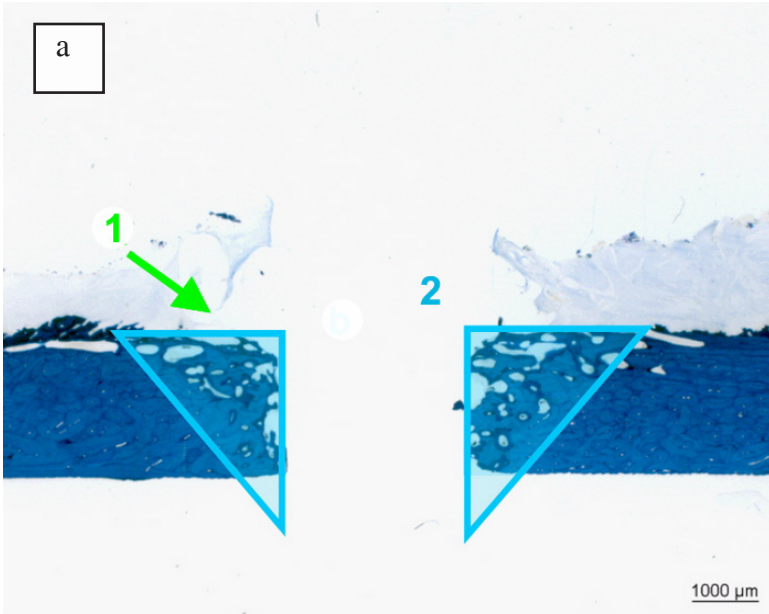


Abb. 20: Die Bilder von PLA-Implantaten bei 2 Monaten (a) und 6 Monaten (b) zeigen die PLA-Schmelzkappe (1), sowie den Umbaukeil (2).

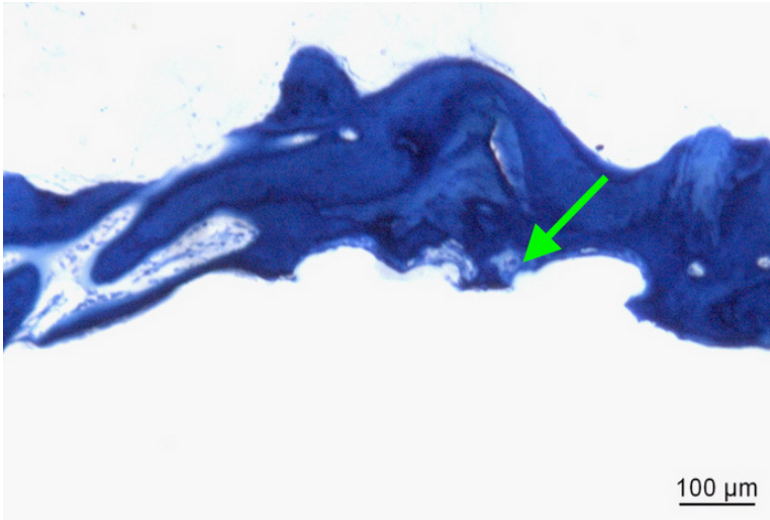


Abb. 21: Titan 6 Monate Längsschnitt
Der Pfeil deutet auf eine Einfaltung im Polymer, die nur teilweise von Knochen aufgefüllt ist. Der Knochen hat wie ein Füßchen Kontakt mit der Polymeroberfläche.

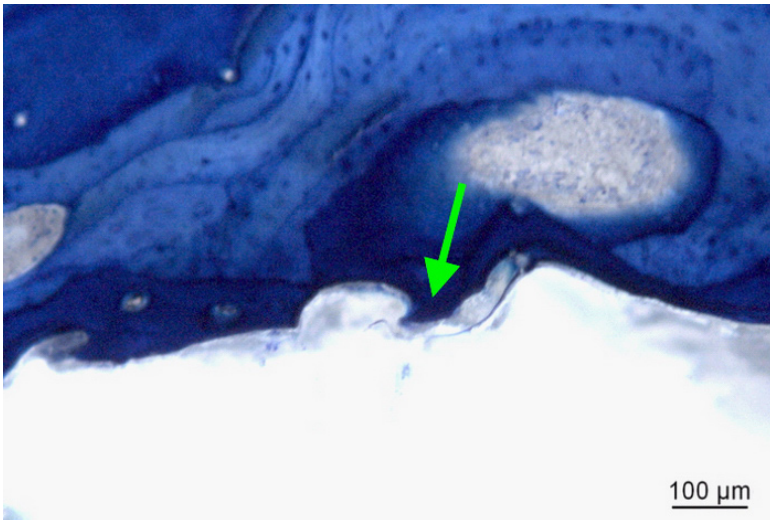


Abb. 22: Titan 6 Monate Querschnitt
In diesem Beispiel liegt Knochengewebe nahtlos bis in jede Einkerbung dem Implantat an.

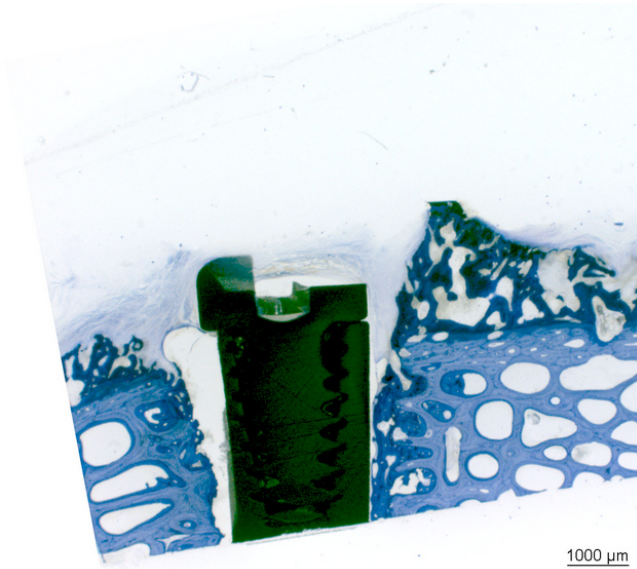


Abb. 23: Titan 2 Monate, Längsschnitt

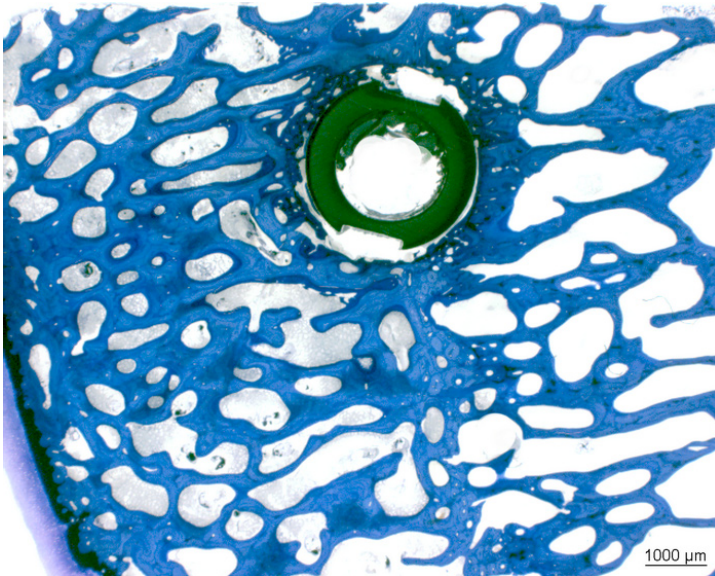


Abb. 24: Titan 2 Monate, Querschnitt

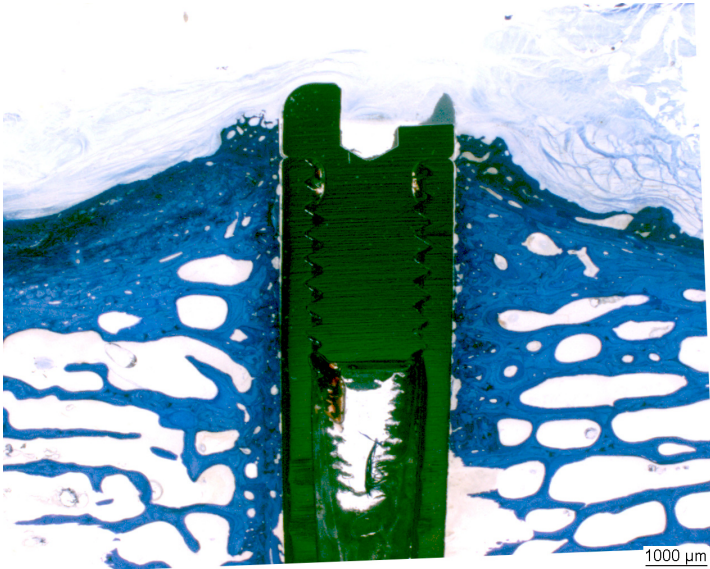


Abb. 25: Titan 6 Monate, Längsschnitt

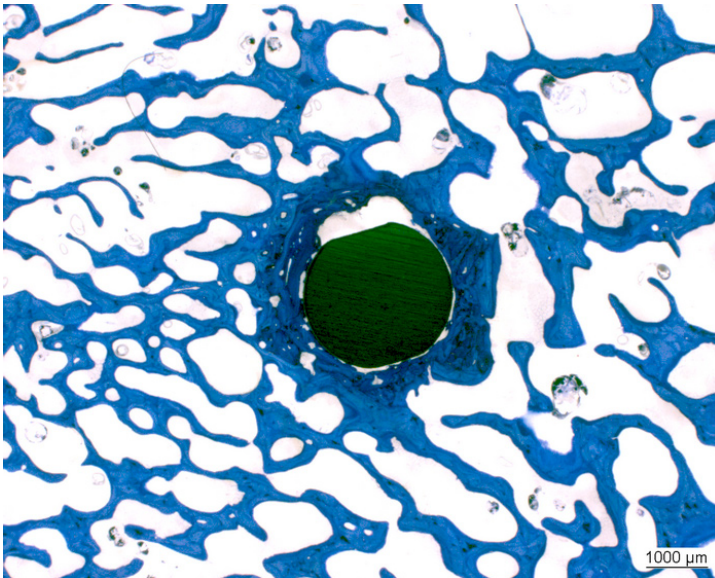


Abb. 26: Titan 6 Monate, Querschnitt

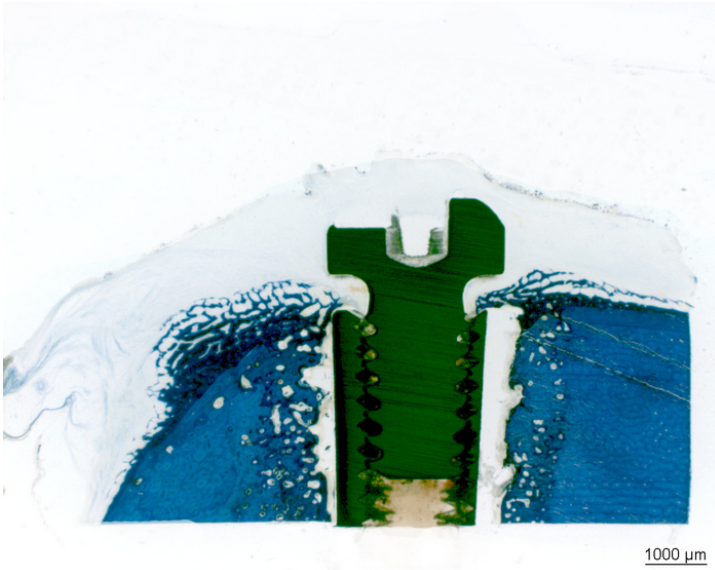


Abb. 27: Titan 2 Monate, Längsschnitt

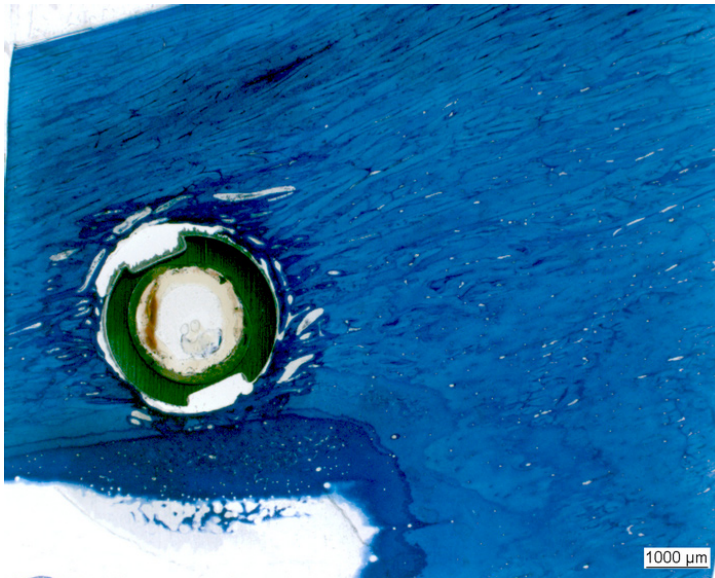


Abb. 28: Titan 2 Monate, Querschnitt

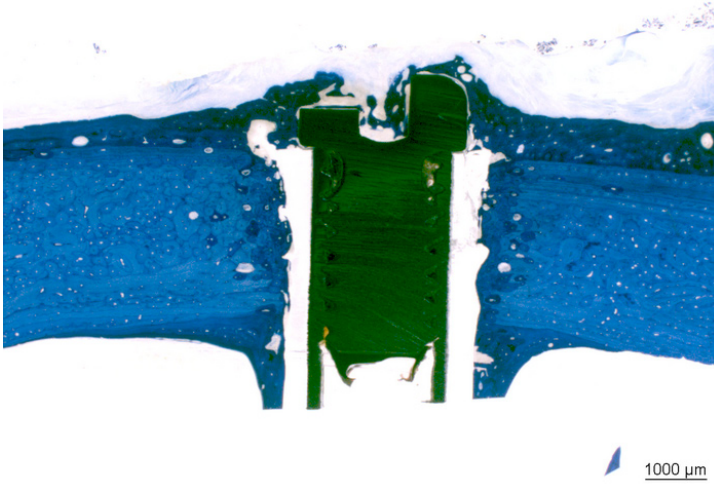


Abb. 29: Titan 6 Monate, Längsschnitt



Abb. 30: Titan 6 Monate, Querschnitt

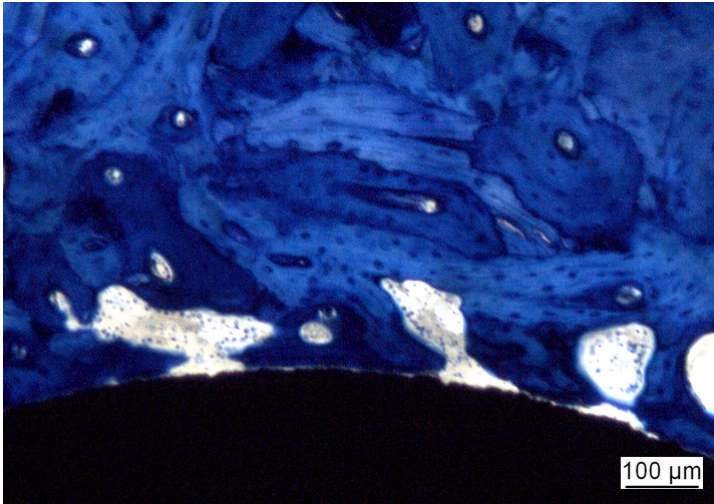


Abb. 31: Überbrückung des Spalttes zwischen Implantat und Bohrloch bindegewebsfrei durch Knochen

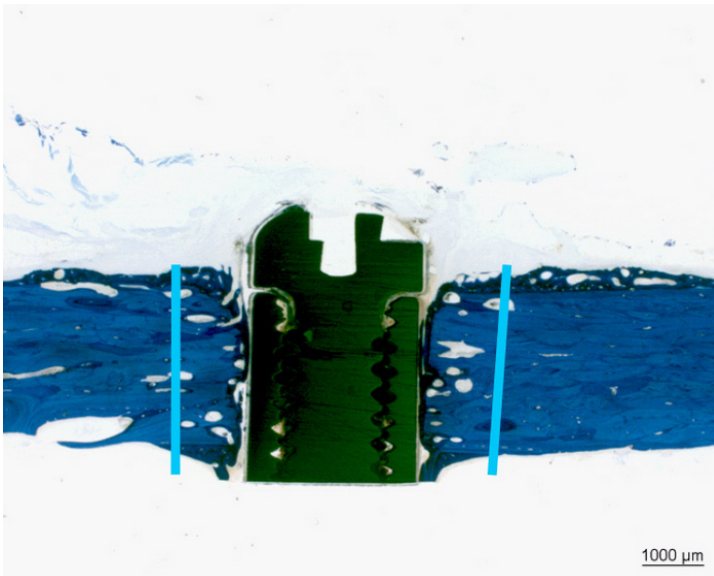


Abb. 32: Die Umbauzone beim Titanimplantat war weitaus schwächer ausgeprägt und zylindrisch geformt.

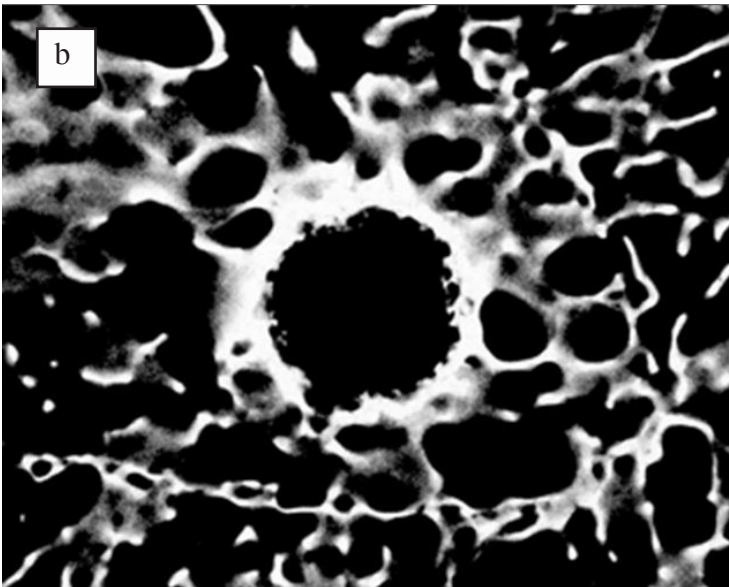
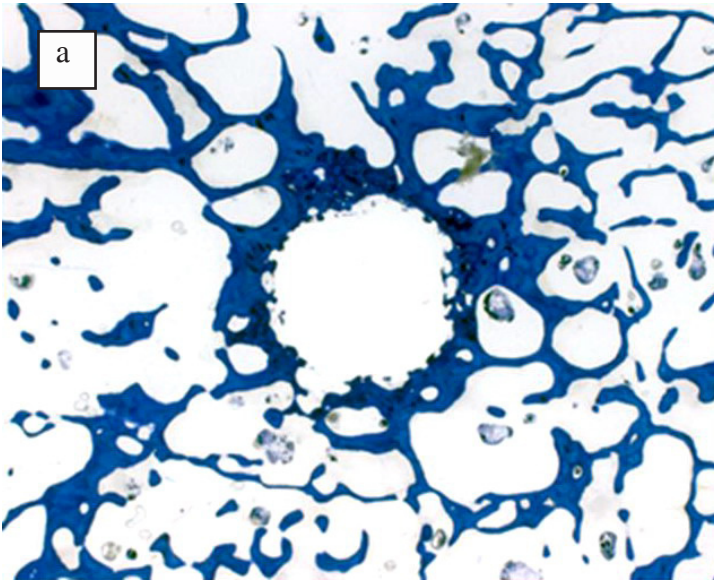


Abb. 33: Gegenüberstellung von mit Toluidin Blau gefärbtem Schnitt (a) und einer Mikrorradiographie (b). Die angefärbten Knochenstrukturen (blau) stimmen mit den röntgendichten Bereichen (hell) überein.

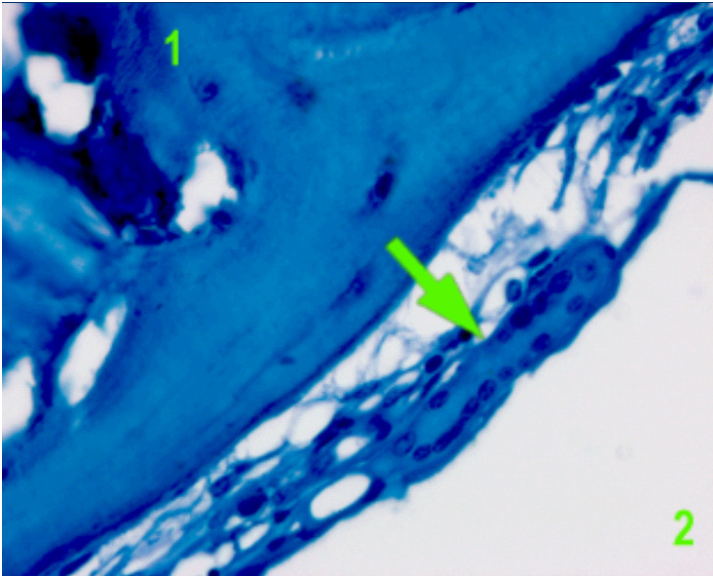


Abb. 34: Mehrkernige Riesenzelle (Pfeil)
Eine vielkernige Riesenzelle (Pfeil) liegt dem Kunststoff (2) direkt auf. (1): Knochen

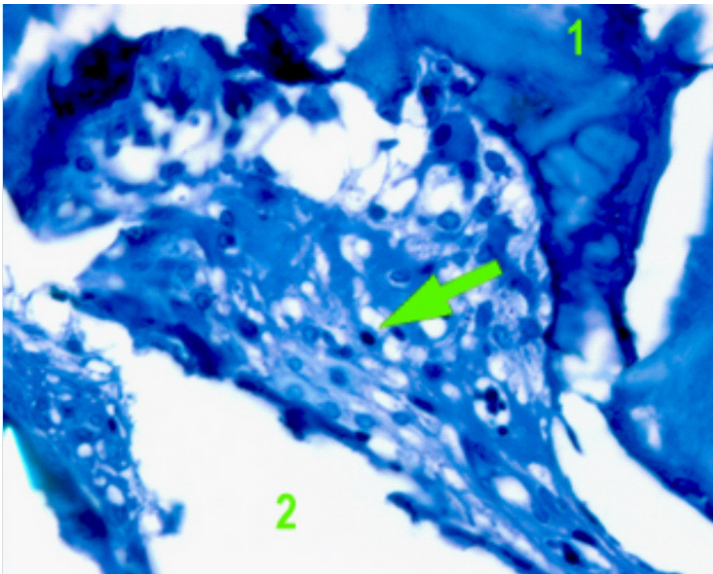


Abb. 35: Rundzelle (Pfeil)
Vereinzelt auftretende rundzellige Infiltrate in der Nähe des Implantates.

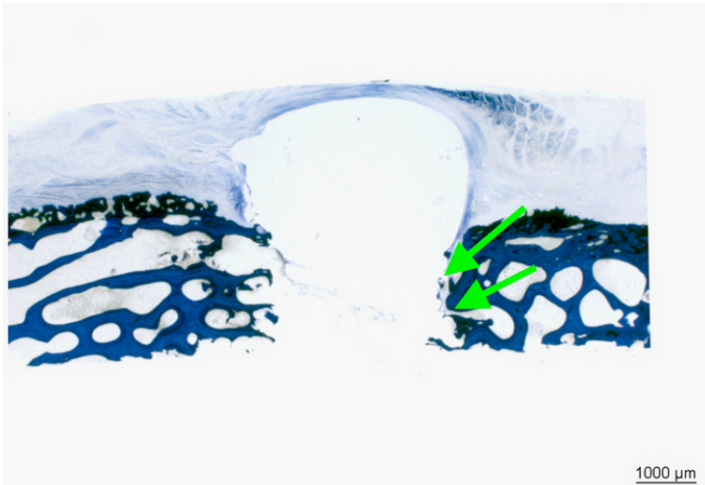


Abb. 36: Eingerolltes PLA

Die Pfeile weisen auf eine gut sichtbare Stelle, an der sich der Kunststoff beim Einschmelzen auffaltete und die typischen Kerben bildete.

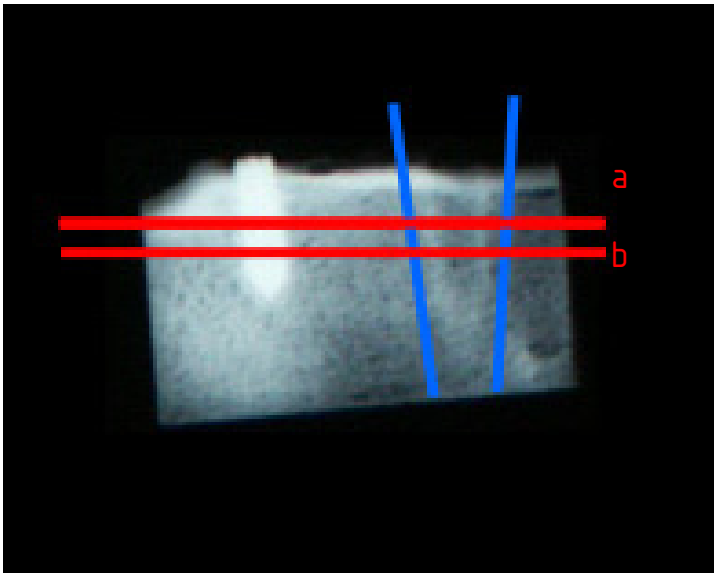


Abb. 37: Die mittlere Schnittebene lag bei Proben der 2-Monate-Gruppe (a) leicht weiter proximal zum Implantat als bei der 6-Monate-Gruppe (b). Die Verjüngung des Implantates ist mit den blauen Linien verdeutlicht.

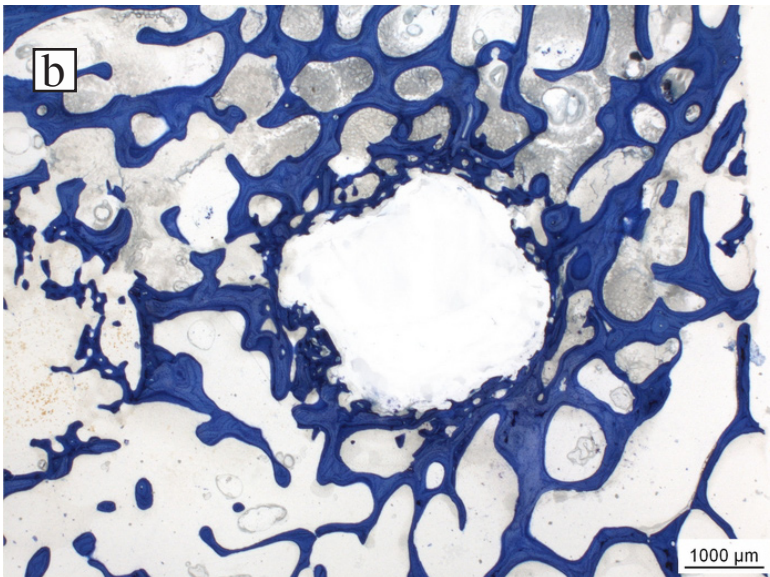
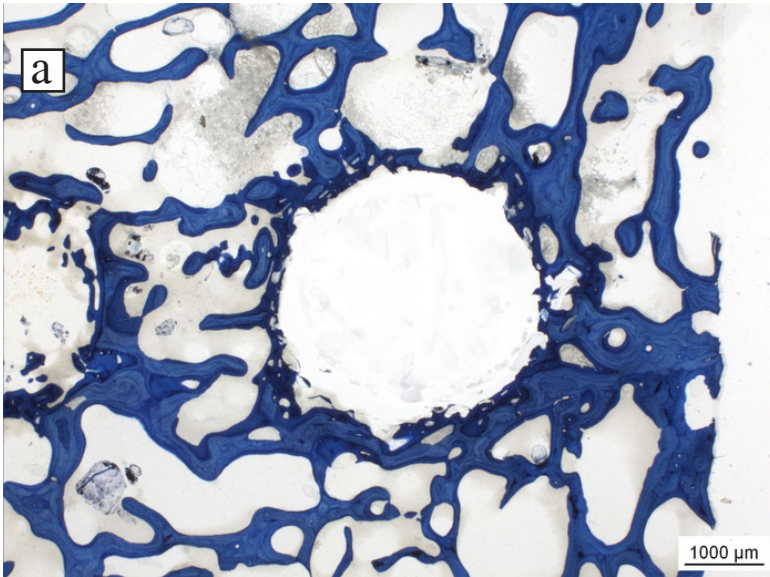


Abb. 38: Anhand dieses Beispiels eines PLA-Implantates bei 2 Monaten, kann gezeigt werden, dass der verringerte Implantatdurchmesser von proximal (a) nach distal (b) nicht degradationsbedingt ist.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg für das faszinierende Thema bedanken. Ihren fachlichen wie auch menschlichen Einsatz habe ich sehr schätzen gelernt.

Herrn Dr. Jörg Mayer möchte ich als zusätzlichen Betreuer für die Zusammenarbeit und Unterstützung in diesem Projekt danken.

Herrn Stephen Ferguson PhD danke ich herzlich für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Lutz-Peter Nolte möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Herzlichen Dank an Frau Kati Zlinsky und Sabina Wunderlin für die Einweisung und Hilfe bei der Herstellung der Histologieschnitte. Sie haben einen grossen Anteil an den erfolgreich etablierten Methoden.

Den AnästhesistInnen des Tierspitals möchte ich für die hervorragende Anästhesie der Schafe, den TierpflegerInnen und dem Ehepaar Knüsel für die Betreuung und Fürsorge der Versuchstiere danken.

Bei meinen MSRU- TeamkollegInnen möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche bedanken.

Hervorzuheben ist mein Kollege Jan Kümmerle, aus dessen Händen ich das Projekt übernommen habe. Für die viele Arbeit im Vorfeld und zu Beginn des Versuches nochmals ein großes Dankeschön!

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, kann ich nicht genug für Ihre Unterstützung auf meinem Lebensweg danken.

Abschließend möchte ich mich bei Frau Jutta Roßgotterer bedanken, die mir mit ihrer Geduld und gestalterischen Kompetenz die Fertigstellung der Dissertation sehr erleichtert hat.

Curriculum vitae

Name	Jens David Langhoff
Geburtsdatum	11.06.1976
Geburtsort	Köln
Nationalität	Deutsch

Schulischer Werdegang

1982-1986	Grundschule in Betzdorf
1986-1993	Gymnasium in Betzdorf
1993-1995	Gymnasium in Siegen
1995	Abitur

1995-1996	Zivildienst, Altenpflege im Altenheim Kirchen a.d. Sieg
-----------	---

Studium

1996- 2002	Studium der Veterinärmedizin an der an der Universität Leipzig
2000	Praktikum in der Dar West Vetenary Clinic, Dar Es Salaam, Tanzania
2002	Abschlussprüfung an der Universität Leipzig
2000-2002	Vorstandstätigkeit bei Tierärzte ohne Grenzen eV

Weitere Ausbildung

2002-2005	Anfertigung der Dissertation in der Musculoskeletal Research Unit, Pferdekllinik der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich
ab 2004	PhD-Studium an der Graduate School Bern